



**Bianca Catarina  
Guimarães da Silva**

**Fabrico de scaffolds porosos de vidro bioativo para  
regeneração óssea**





**Universidade de Aveiro**  
2015

Departamento de Engenharia de Materiais e  
Cerâmica

**Bianca Catarina  
Guimarães da Silva**

**Fabrico de scaffolds porosos de vidro bioativo para  
regeneração óssea**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor José Maria da Fonte Ferreira, Professor Associado com Agregação do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro, e da Doutora Susana Maria Henriques Olhero, Pós-Doc do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro.



## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor Joaquim Manuel Vieira**

Professor Catedrático no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica, UA

**Prof. Doutor Fernando Jorge Lino Alves**

Professor associado do Departamento de Engenharia Mecânica, FEUP

**Prof. Doutor José Maria da Fonte Ferreira**

Professor associado com agregação no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica,  
UA



## **agradecimentos**

Este espaço limitado não me permite agradecer, como devia, a todas as pessoas que ao longo deste percurso me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica. Por essa razão, deixo algumas palavras, com um sentido e profundo sentimento de reconhecido agradecimento.

Aos meus orientadores, o Prof. Dr. José Maria Ferreira e a Dra. Susana Olhero, agradeço pela forma como me orientaram e acompanharam neste trabalho, por todo o apoio e disponibilidade, pelo saber que me transmitiram, pelas opiniões e críticas, pela total colaboração no solucionar de dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho e por todas as palavras de incentivo.

A todos os técnicos do DEMaC por toda a ajuda e disponibilidade prestada na caracterização das minhas amostras.

Aos meus colegas de laboratório pela ajuda e por todo o apoio. Agradeço, de forma especial, à Catarina Marques, pelo tempo despendido e pela partilha de conhecimentos, que me permitiram que cada dia fosse encarado com particular motivação.

Aos meus colegas do mestrado por estes dois anos de amizade, companhia e afeto.

A todos os meus amigos por terem sido a chave de todo o incentivo, pela infinita ajuda, dedicação e paciência.

Ao meu irmão, pelos sorrisos, abraços e pela motivação constante.

À minha família, em especial aos meus pais, um enorme obrigada por me concederem mais uma realização pessoal e profissional, por todo o apoio, compreensão, paciência, carinho e amor demonstrado ao longo da minha vida. A eles, dedico todo este trabalho.





## palavras-chave

Engenharia de Tecidos, *scaffolds*, vidro bioativo, *robocasting*.

## resumo

A Engenharia de Tecidos é um domínio multidisciplinar com o objetivo de desenvolver substitutos biológicos para a regeneração, reparação ou restauração de funções de órgãos ou tecidos. Os *scaffolds* são materiais porosos tridimensionais que servem de matrizes para a adesão e proliferação das células, bem como para a produção de matriz extracelular, idealmente, à taxa a que decorre a degradação do *scaffold*. A concepção de estruturas adequadas para suportar o restauro ou melhorar a função de tecidos é um dos maiores desafios da Engenharia de Tecidos.

O presente estudo teve como objetivo a produção e caracterização de *scaffolds* de vidro bioativo, de composição molar 38.49% SiO<sub>2</sub> – 36.07% CaO – 19.24% MgO – 5.61% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – 0.59% CaF<sub>2</sub>, utilizando um processo de fabrico aditivo, que teve por base a construção de objetos 3-D a partir de um modelo de desenho assistido por computador, utilizando a estratégia de fabrico camada a camada. Utilizou-se para tal um equipamento de deposição robótica (3D Inks, LLC, modelo EBRD-A32\_-0\_).

O trabalho desenvolvido incluiu diferentes etapas, tais como: (i) preparação e caracterização reológica de suspensões concentradas à base de vidro bioativo em meio aquoso, estudo do dispersante mais adequado e da respetiva quantidade para a obtenção de uma suspensão suficientemente fluida e ao mesmo tempo concentrada em sólidos para minimizar as variações dimensionais ao longo do processo; (ii) estudo dos efeitos dos aditivos de processamento e das suas quantidades necessárias para transformarem a suspensão fluida numa pasta extrudível, com rigidez suficiente para manter a forma do filamento cilíndrico após a extrusão, e a caracterização reológica da tinta; (iii) fabrico dos *scaffolds* através da técnica de *robocasting*; e por fim (iv) a caracterização das estruturas obtidas quanto às propriedades morfológicas e mecânicas.

Os resultados obtidos mostraram que o vidro bioativo permite a preparação de pastas com características reológicas adequadas para a deposição camada a camada por *robocasting*. Os *scaffolds* obtidos apresentam geometrias bem definidas e distribuições de poros uniformes, confirmando a adequabilidade da técnica para o fabrico de *scaffolds* porosos de vidro bioativo com estruturas apropriadas para aplicações nas áreas da Engenharia de Tecidos e da Medicina Regenerativa.



**keywords**

Tissue Engineering, scaffolds, bioactive glass, robocasting.

**abstract**

Tissue Engineering is a multidisciplinary field aiming at developing biological substitutes for regeneration and repair or restore functions of organs or tissues. The three-dimensional porous scaffolds serve as supports for cell attachment and proliferation as well as the production of extracellular matrix, ideally, at the same rate as scaffold degrades. The design of structures suitable to support the restoration or improve tissue function is one of the biggest challenges of Tissue Engineering.

This study aimed to the production and characterization of bioactive glass scaffolds, with molar composition of 38.49% SiO<sub>2</sub> – 36.07% CaO – 19.24% MgO – 5.61% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – 0.59% CaF<sub>2</sub>, using an additive manufacturing process, which was based on the construction of 3-D objects from a computer-assisted design model, using the manufacturing strategy of layer by layer. For such a robocasting machine (3D Inks, LLC, modelo EBRD-A32\_-0\_) was used.

The work included different steps such as: (i) preparation and rheological characterization concentrated aqueous suspensions of bioactive glass, and study of the most effective dispersing agents and their respective amounts for obtaining a sufficiently fluid while high solids loaded suspension to minimize dimensional variations throughout the process; (ii) studying the effects of processing additives and their required amounts for transforming the fluid suspension into an extrudable paste with enough stiffness for the cylindrical filaments to maintain the shape after extrusion, and rheological characterization of the inks; (iii) manufacturing of the scaffolds through the robocasting technique; (iv) characterization of the 3-D structures obtained for their morphological and mechanical properties.

The results obtained demonstrated that the bioactive glass allows the preparation of inks with appropriate rheological characteristics to be deposited layer by layer by robocasting. The resulting scaffolds exhibit well-defined geometries and uniform pore size distributions, confirming its suitability for the fabrication of porous bioactive glass scaffolds with appropriate structures for being applied in the areas of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.



# Índice

Índice de Imagens .....	iii
Índice de Tabelas .....	vii
Abreviaturas .....	ix
Capítulo 1.....	1
1. Introdução .....	3
1.1. Objetivos .....	4
1.2. Estrutura da tese.....	4
Capítulo 2.....	5
2.1. Os ossos .....	7
2.1.1. Remodelação óssea .....	10
2.1.2. Reconstrução de defeitos ósseos.....	12
2.2. Engenharia de tecidos - <i>Scaffolds</i> .....	13
2.3. Biomateriais.....	18
2.3.1. Vidros bioativos.....	20
2.4. Técnicas de processamento.....	24
2.4.1. Robocasting.....	27
2.4.2. Estabilidade coloidal .....	28
Capítulo 3.....	33
3. Procedimento Experimental.....	35
3.1. Preparação e caracterização do vidro bioativo.....	35
3.1.1. Caracterização cristalográfica .....	37
3.1.2. Análise morfológica.....	37
3.1.3. Análise Térmica Diferencial e Termogravimétrica .....	38
3.2. Preparação e caracterização das suspensões .....	38
3.3. Preparação e caracterização das pastas.....	41
3.4. Preparação e caracterização dos <i>scaffolds</i> .....	44
Capítulo 4.....	51
4. Resultados e Discussão .....	53
4.1 Caracterização dos pós de vidro .....	53
4.1.1. Caracterização cristalográfica .....	53

4.1.2. Análise granulométrica .....	53
4.1.3. Análise morfológica .....	57
4.1.4. Análise térmica diferencial e Termogravimétrica.....	59
4.2. Caracterização das suspensões .....	60
4.3. Caracterização das pastas.....	65
4.4. Caracterização dos <i>scaffolds</i> .....	74
4.4.1. Análise morfológica .....	74
4.4.2. Tamanho de poro .....	77
4.4.3. Porosidade .....	78
4.4.4. Ensaio mecânicos .....	78
Capítulo 5.....	83
5. Conclusões e Futuros Desenvolvimentos .....	85
Referências .....	87

# Índice de Imagens

Figura 1 - Configuração dos ossos [8].	7
Figura 2 - Osso longo. (a) Osso longo jovem (fêmur) evidenciando a epífase, as placas epifisárias e a diáfise. (b) Osso longo adulto com linhas epifisárias. (c) Características interiores de uma porção da diáfise representada em (a) [8].	8
Figura 3 - Reparação do osso. (1) Formação de hematoma após uma fratura. (2) Formação do calo. O calo interno substitui o hematoma. O calo externo confere suporte. (3) Ossificação do calo. O osso esponjoso reticular substitui a cartilagem no calo interno e no calo externo. (4) A remodelação do osso substitui o osso reticular do calo ósseo e o osso morto adjacente ao local de fratura por osso compacto. A cura está completa [8].	11
Figura 4 - Representação esquemática da função dos <i>scaffolds</i> em ET. Adaptado de [25].	14
Figura 5 - Ilustração gráfica de um conceito de construção de um <i>scaffold</i> 3-D personalizado. Adaptado de [62].	27
Figura 6 - Esquema ilustrado do equipamento de robocasting [66].	28
Figura 10 - Distribuição de contra-íões à superfície de uma partícula [73].	29
Figura 7 - Frita do vidro bioativo TCP-20.	36
Figura 8 - Equipamento de análise do tamanho de partícula, Coulter LS230.	37
Figura 9 - a) Microscópio eletrônico de varrimento; b) Depositador de carbono.	38
Figura 11 - Modelo CAD dos <i>scaffolds</i> fabricados, com diferentes tamanhos de poro: (a) 200 $\mu\text{m}$ , (b) 300 $\mu\text{m}$ e (c) 500 $\mu\text{m}$ .	44
Figura 12 - Parâmetros dos <i>scaffolds</i> : (a) Distância entre filamentos; (b) Tamanho de poro; (c) Largura do filamento.	45
Figura 13 - Seringa de 5ml contendo a pasta a ser extrudida no <i>robocasting</i> .	46
Figura 14 - Equipamento de ensaios mecânicos.	47
Figura 15 - Representação esquemática do procedimento realizado ao longo do trabalho.	49
Figura 16 - Espectro de DRX da frita do vidro bioativo.	53
Figura 17 - Evolução da distribuição granulométrica das partículas de vidro bioativo ao longo do processo de moagem no moinho de rolos.	55
Figura 18 - Evolução da distribuição granulométrica das partículas de vidro bioativo no processo de moagem no moinho de atrito.	56
Figura 19 - Evolução da distribuição granulométrica das partículas de vidro bioativo ao longo das várias etapas do processo de moagem.	56
Figura 20 - Micrografias obtidas por SEM das partículas de vidro com tamanho médio de 4 $\mu\text{m}$ na ausência a) e na presença b) de dispersante.	57
Figura 21 - Micrografias obtidas por SEM das partículas de vidro com tamanho médio de 1 $\mu\text{m}$ na ausência a) e na presença b) de dispersante.	58
Figura 22 - Micrografias obtidas por SEM das partículas de vidro com tamanhos médios de a) 1 $\mu\text{m}$ e b) 4 $\mu\text{m}$ .	59
Figura 23 - Curva de análise termogravimétrica e térmica diferencial do biovidro.	59

Figura 24 - Curvas de fluxo das suspensões de TCP-20 em meio aquoso contendo 45 vol.% de sólidos, preparadas com 0.5 wt.% de Targon 1128, Dispex A40 e Darvan 821A.	60
Figura 25 - Curvas de fluxo das suspensões à base de TCP-20, preparadas com diferentes concentrações de Targon 1128.	61
Figura 26 - Curva de desfloculação das suspensões preparadas à base de TCP-20, com diferentes concentrações de Targon 1128.	61
Figura 27 - Curvas de eletroforese do TCP-20 na ausência e na presença de 0.5 wt.% de Targon 1128.	62
Figura 28 - Distribuição granulométrica das partículas de vidro bioativo com três tamanhos médios diferentes.	63
Figura 29 - Curvas de fluxo das suspensões concentradas de TCP-20 com diferentes tamanhos de partícula.	63
Figura 30 - Ilustração esquemática dos comportamentos reo-fluidificante (A) e reo-espessante (B). Adaptado de [84].	64
Figura 31 - Curvas de distribuição granulométrica de misturas de pós com diferentes tamanhos de partículas, em diferentes proporções.	65
Figura 32 - Curvas de fluxo de suspensões preparadas de misturas de pós com diferentes tamanhos de partículas, em diferentes proporções.	65
Figura 33 - Efeitos da adição dos aditivos de processamento nas curvas de fluxo de uma suspensão com 45 vol.% de sólidos e 0.5 wt.% de Targon 1128. A suspensão inicial foi diluída para 43 vol.% de sólidos na presença de 2 wt.% de HPMC, e para 40 vol.% de sólidos com a posterior adição a esta de 2.28 wt.% de PEI.	66
Figura 34 - Curvas de fluxo de suspensões com 45 vol.% de sólidos, preparadas com 0.5 wt.% de Targon 1128, e com diferentes teores de TAC (1 wt.% e 2 wt.%).	67
Figura 35 - Curva de fluxo da suspensão com 47 vol.% de sólidos, 0.5 wt.% de Targon 1128, 2 wt.% de HPMC e 1 wt.% de TAC.	68
Figura 36 - Curvas de fluxo das pastas preparadas na presença de diferentes concentrações de CMC-250.	69
Figura 37 - Curvas de fluxo das pastas preparadas na presença de diferentes concentrações de sólidos.	69
Figura 38 - Componente elástica da pasta com 40 vol.% de sólidos, preparada com 0.5 wt.% de Targon 1128, 2 wt.% de HPMC e de 2.28 wt.% PEI.	71
Figura 39 - Componente elástica das pastas preparadas com diferentes concentrações de CMC-250.	71
Figura 40 - Componente elástica das pastas preparadas com diferentes concentrações de sólidos e de CMC-250.	73
Figura 41 - Micrografias obtidas por SEM dos <i>scaffolds</i> com tamanhos de poro de 200 µm derivados de pastas com diferentes formulações: a) 47 vol.% de sólidos, 0.5 wt.% de Targon 1128, 2 wt.% de HPMC e 1 wt.% de TAC; b) 48 vol.% de sólidos e 2 wt.% de CMC-250.	74
Figura 42 - Micrografias obtidas por SEM dos <i>scaffolds</i> com tamanhos de poro de 300 µm com diferentes composições: a) 47 vol.% de sólidos, 0.5 wt.% de Targon 1128, 2 wt.% de HPMC e 1 wt.% de TAC; b) 48 vol.% de sólidos e 2 wt.% de CMC-250.	75



Figura 43 - Micrografias obtidas por SEM dos <i>scaffolds</i> com tamanhos de poro de 500 $\mu\text{m}$ com diferentes composições: a) 47 vol.% de sólidos, 0.5 wt.% de Targon 1128, 2 wt.% de HPMC e 1 wt.% de TAC; b) 48 vol.% de sólidos e 2 wt.% de CMC-250.....	76
Figura 44 - Micrografias obtidas por SEM da microestrutura dos <i>scaffolds</i> com diferentes composições: a) 47 vol.% de sólidos, 0.5 wt.% de Targon 1128, 2 wt.% de HPMC e 1 wt.% de TAC; b) 48 vol.% de sólidos e 2 wt.% de CMC-250. ....	77
Figura 45 - Resistência à compressão dos diferentes <i>scaffolds</i> preparados com Targon, HPMC e TAC. ....	79
Figura 46 - Resistência à compressão dos diferentes <i>scaffolds</i> preparados com CMC-250. ....	79



## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Tipos de células ósseas e respectivas funções. Adaptado de [2].	10
Tabela 2 - Algumas vantagens e desvantagens dos três tipos de enxertos ósseos mais utilizados. Adaptado de [23].	13
Tabela 3 - Funções da matriz extracelular em tecidos nativos e de <i>scaffolds</i> em tecidos artificiais. Adaptado de [4].	15
Tabela 4 - Composição de vitrocerâmicos e vidros bioativos (em percentagem de peso). Adaptado de [35].	24
Tabela 5 - Vantagens e desvantagens de diferentes técnicas de fabrico. Adaptado de [59].	25
Tabela 6 - Matérias-primas utilizadas no fabrico do vidro bioativo.	35
Tabela 7 - Dispersantes testados e respectivas quantidades.	39
Tabela 8 - Resumo das diferentes misturas de tamanhos de partícula testadas.	40
Tabela 9 - Vol.% de sólidos e wt.% de CMC-250 utilizados na preparação das suspensões.	42
Tabela 10 - Tipos de aditivos e concentrações testadas.	43
Tabela 11 - Parâmetros de <i>design</i> e de processamento dos <i>scaffolds</i> .	45
Tabela 12 - Dimensões dos <i>scaffolds</i> utilizados nos ensaios mecânicos de compressão.	48
Tabela 13 - Tamanhos de poro dos <i>scaffolds</i> após sinterização e respetiva retração.	77
Tabela 14 - Valores de porosidade média para cada composição estudada e respetivos desvios padrão.	78
Tabela 15 - Módulos de Young obtidos para os <i>scaffolds</i> com diferentes porosidades.	80



## Abreviaturas

**3-D** – Tridimensional

**$\beta$ -TCP** –  $\beta$ -fosfato tricálcico

**CAD** – Desenho assistido por computador

**CMC-250** – Carboximetilcelulose

**DRX** – Difração de raio-X

**ET** – Engenharia de Tecidos

**FastOs® BG** – Nome comercial atribuído ao biovidro

**HA** – Hidroxiapatite

**HCA** – Hidroxiapatite carbonatada

**HPMC** – Hidroxipropilmetilcelulose

**MRI** – Imagiologia de ressonância magnética

**PEI** – Polietilenimina

**SBF** – Fluido fisiológico simulado

**SEM** – Microscopia eletrônica de varrimento

**TC** – Tomografia computadorizada

**TCP-20** – Referência composicional atribuída ao biovidro

**T<sub>g</sub>** – Temperatura de transição vítrea

**TMAH** – Hidróxido de tetrametilamônio



# Capítulo 1

---

## Introdução e Objetivos





## 1. Introdução

Nos últimos anos tem-se assistido a uma melhoria das condições de vida e da prestação de cuidados de saúde que conduziram ao aumento da esperança média de vida e ao consequente envelhecimento da população [1]. À medida que as pessoas envelhecem, surgem algumas doenças, e o sistema esquelético é fortemente afetado, surgindo problemas ósseos. O osso é um tecido vivo, complexo, dinâmico e altamente vascularizado, que desempenha diversas funções essenciais ao equilíbrio vital: fornece o apoio estrutural ao corpo, protege as estruturas vitais, é a base mecânica do movimento e serve de reservatório mineral. Por isso, quando se verificam alterações na sua estrutura, devido a lesão ou doença, o equilíbrio fisiológico deste tecido e do próprio organismo sofrem uma alteração drástica, que pode afetar a qualidade de vida [2].

Apesar dos importantes avanços no campo da medicina regenerativa do tecido ósseo ao longo dos últimos anos, as terapias atuais, como o recurso aos enxertos ósseos, ainda apresentam várias limitações [3]. É neste contexto que surge a Engenharia de Tecidos (ET), fundamentalmente descrita como um novo domínio multidisciplinar que tem como objetivo o desenvolvimento de substitutos biológicos capazes de restaurar, substituir ou regenerar a forma e a função dos tecidos. As células, os *scaffolds* e os fatores de crescimento são os principais componentes da ET. Os *scaffolds* servem como estruturas de suporte temporário, proporcionando suporte tridimensional para o crescimento de tecido e a sua formação adequada, e um ambiente biológico favorável para o crescimento e diferenciação das células [4].

Um material é definido como biocompatível se não induzir resposta inflamatória, não for imunogénico e não for citotóxico para as células e os tecidos. A biocompatibilidade é uma característica que o material deve ter aquando da sua implantação mas também durante a sua vida útil como implante, ou seja, os produtos da sua degradação também devem ser biocompatíveis [5].

Os materiais destinados à produção de *scaffolds* devem idealmente imitar a estrutura e as funções biológicas do osso nativo, tanto em termos da composição química como das propriedades físicas [4]. A utilização de vidros bioativos para aplicação na regeneração óssea tem revelado características vantajosas. O produto de dissolução destes vidros bioativos, cujos constituintes estão presentes na fase mineral dos ossos, provoca uma rápida expressão dos genes que regulam a osteogénese e a produção de fatores de crescimento [6].

A porosidade do *scaffold*, o tamanho dos poros, a sua morfologia e interligação são propriedades essenciais para uma boa adesão e proliferação celulares e para a consequente formação de um novo tecido a três dimensões. Os *scaffolds* para aplicações no tecido ósseo devem mimetizar a morfologia, estrutura e função do osso, a fim de otimizar a integração no tecido circundante [7].

## 1.1. Objetivos

O objetivo deste trabalho de investigação centra-se na produção e caracterização de *scaffolds* porosos à base de vidro bioativo, para regeneração óssea, utilizando um processo de fabrico aditivo, o *robocasting*. Esta técnica tem por base a construção de objetos 3-D (tridimensionais) a partir de um modelo de desenho assistido por computador (CAD), utilizando a estratégia de fabrico camada a camada. As estruturas obtidas serão caracterizadas quanto às propriedades morfológicas e mecânicas.

Para tal, o trabalho a desenvolver incluirá diferentes etapas tais como:

(i) a preparação de suspensões e pastas; (ii) a fabricação dos *scaffolds* através da técnica de *robocasting*; (iii) a caracterização das estruturas obtidas. O processo de fabrico a estudar tem como principal vantagem a possibilidade de fabrico de componentes 3-D com formas, dimensões e estrutura interna complexas feitos por medida. Isto permitirá ajustar os parâmetros de fabrico de acordo com as propriedades desejadas para os componentes tendo em conta as suas aplicações específicas.

## 1.2. Estrutura da tese

A presente tese está organizada em cinco capítulos. O capítulo 1 introduz o tema da tese e apresenta os objetivos que presidiram ao presente trabalho bem como a estrutura da mesma. No capítulo 2 é feita uma revisão da bibliografia para a contextualização e para um melhor entendimento deste trabalho. No capítulo 3 está descrito detalhadamente todo o procedimento experimental, bem como as técnicas de caracterização utilizadas. O capítulo 4 apresenta todos os resultados experimentais obtidos, focando-se na sua análise e discussão. Por fim, no capítulo 5, intitulado “Conclusão e futuros desenvolvimentos”, é feita uma síntese do trabalho realizado e apresentam-se algumas sugestões/recomendações para trabalho futuro.

# Capítulo 2

---

Revisão da Literatura



## 2. Revisão da Literatura

### 2.1. Os ossos

O sistema esquelético, constituído por ossos, cartilagens, tendões e ligamentos, confere suporte e proteção, possibilita os movimentos do corpo, armazena minerais e gordura, e é um local de produção de células sanguíneas [8].

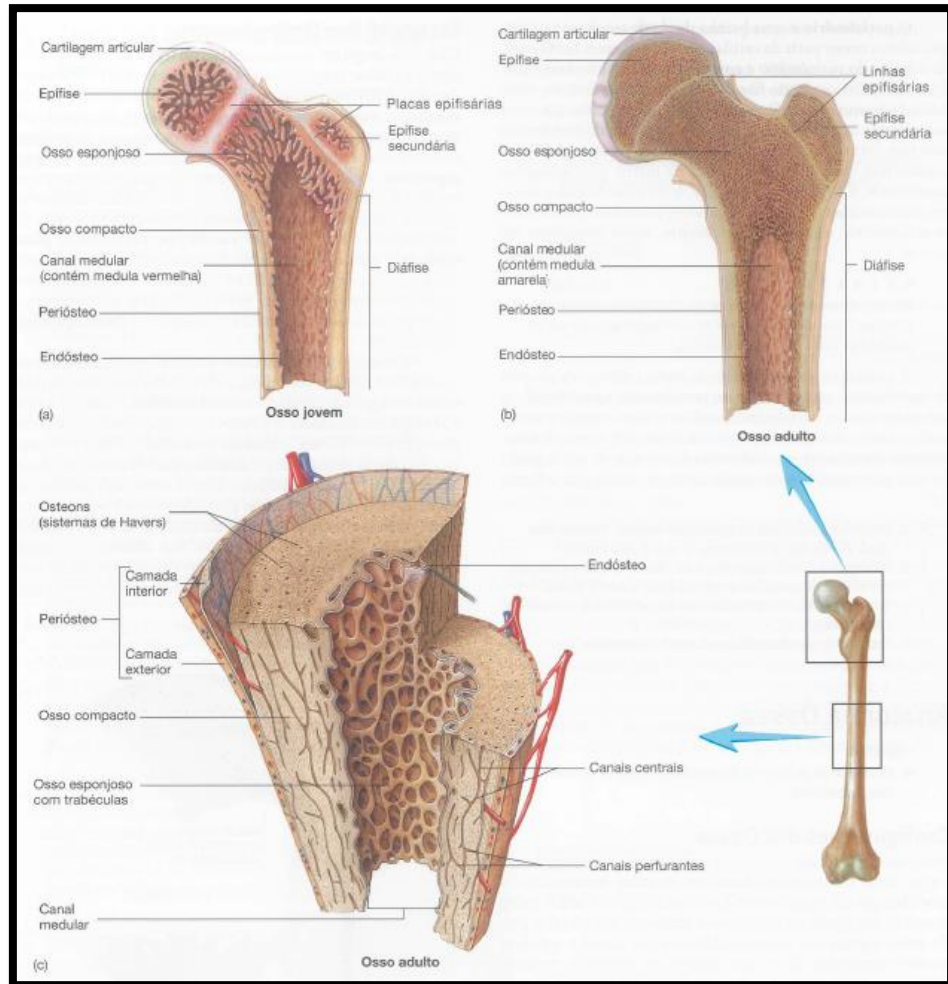
O esqueleto adulto é formado, em média, por 206 ossos e alcança a maturidade aos 25 anos. Dos 206 ossos que compõem o nosso esqueleto, 29 formam o crânio, 26 constituem a coluna vertebral, 25 formam a caixa torácica, 64 integram as duas extremidades superiores e 62 as inferiores [9].

Os ossos são estruturas muito resistentes e elásticas. Cada osso pode ser classificado de acordo com a sua forma como longo, curto, achatado, ou irregular (Figura 1). As suas dimensões variam: do fémur, que por vezes supera meio metro, aos diminutos ossículos do ouvido médio, com alguns milímetros de comprimento [9].



Figura 1 - Configuração dos ossos [8].

Cada osso longo em crescimento possui três componentes principais: a diáfise, as epífises e a placa epifisária (Figura 2a).



**Figura 2 - Osso longo. (a) Osso longo jovem (fêmur) evidenciando a epífase, as placas epifisárias e a diáfise. (b) Osso longo adulto com linhas epifisárias. (c) Características interiores de uma porção da diáfise representada em (a) [8].**

A diáfise, ou corpo do osso, é composta fundamentalmente por osso compacto, na sua maior parte constituído por matriz óssea que rodeia alguns pequenos espaços. As epífises são compostas principalmente por osso esponjoso. A superfície exterior da epífise é composta por uma camada de osso compacto [8]. A diáfise dos ossos longos pode conter uma grande cavidade, o canal medular.

O perióstio é uma membrana de tecido conjuntivo fibroso que reveste a superfície exterior de um osso (Figura 2c). A camada fibrosa exterior é formada por tecido conjuntivo denso, irregular, rico em colagénio, que contém vasos sanguíneos e nervos [10].

O endóstio é uma membrana de tecido conjuntivo que reveste as superfícies interiores de todas as cavidades do osso, tais como o canal medular da diáfise e as cavidades mais pequenas do osso esponjoso e do osso compacto (Figura 2). O endóstio consiste numa camada única de células, incluindo osteoblastos, osteoclastos e células progenitoras osteocondrais [10].

Segundo a estrutura macroscópica, o osso pode ser dividido em duas categorias, o osso esponjoso ou trabecular e o osso compacto ou cortical. A principal diferença entre estes dois tipos de osso está na porosidade. O osso compacto é um tecido denso, com uma porosidade de cerca de 10%, com espaços apenas para os osteócitos, canalículos e vasos sanguíneos. Por outro lado, o osso esponjoso apresenta uma morfologia semelhante a uma esponja, com porosidade interconectada entre 50 a 90%, o que faz com que o seu módulo de elasticidade e tensão máxima de compressão sejam 10 vezes menores do que as do osso compacto [11].

As propriedades mecânicas do osso variam amplamente desde o osso esponjoso ao osso cortical. O módulo de Young do osso cortical está entre 15 e 20 GPa, enquanto o do osso esponjoso está entre 0.1 e 2 GPa. A resistência à compressão varia entre 100 e 200 MPa para o osso cortical, e entre 2 e 12 MPa para osso esponjoso [12,13].

O osso é um tecido conjuntivo dinâmico constituído por células vivas numa matriz orgânica mineralizada [14].

A matriz óssea é constituída por material orgânico e inorgânico (35% e 65%, em relação ao seu peso, respetivamente). O material orgânico consiste fundamentalmente em colagénio e proteoglicanos, e o material inorgânico consiste sobretudo em cristais de fosfato de cálcio denominados hidroxiapatite (HA), com a fórmula molecular  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . O colagénio e os componentes minerais são responsáveis pelas principais características funcionais do tecido ósseo. Enquanto o colagénio confere resistência flexível à matriz, os minerais conferem à matriz resistência à compressão (capacidade de suportar o peso) [8].

As células ósseas classificam-se em osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, que têm funções e origens diferentes. Os osteoblastos têm origem nas células progenitoras osteocondrais, produzem a matriz óssea e transformam-se em osteócitos. Os osteoblastos unem-se uns aos outros através de prolongamentos celulares e rodeiam-se de matriz óssea para se tornarem osteócitos. Estes, por sua vez, encontram-se localizados nas lacunas, que se ligam entre si através de canalículos [15]. Os osteoclastos são células multinucleadas especializadas que, com a cooperação dos osteoblastos, destroem

(reabsorvem) tecido ósseo. Estas células têm origem em células estaminais na medula óssea vermelha [14].

Na Tabela 1 estão descritos mais detalhes sobre as características e funções destas células.

**Tabela 1 - Tipos de células ósseas e respectivas funções. Adaptado de [2].**

<b>Tipo de célula</b>	<b>Características morfológicas</b>	<b>Função</b>	<b>Diâmetro (µm)</b>
<b>Osteoblastos</b>	Forma cubica, polarizados e localizados com os seus precursores na superfície do osso, onde formam uma estreita camada de células.	Síntese e regulação da deposição e mineralização da matriz extracelular óssea; Responde a estímulos mecânicos.	Até 30
<b>Osteócitos</b>	Forma de estrela; Possuem menos organelos que os osteoblastos.	Calcificação da matriz óssea; Homeostasia de cálcio no sangue.	Até 100
<b>Osteoclastos</b>	Células polarizadas e multinucleadas.	Reabsorção óssea.	Até 20

O osso cresce em tamanho devido às atividades coletivas das células que produzem, mineralizam e reabsorvem a matriz óssea. As atividades combinadas dos osteoblastos e osteoclastos resultam numa arquitetura óssea que fornece suporte mecânico e proteção, além de servir como um reservatório vital de minerais, principalmente cálcio e fósforo, necessário para a manutenção das atividades normais celulares, neurológicas e vasculares do corpo [14].

Por ser um tecido multifuncional, o osso é responsivo a uma variedade de estímulos, entre eles, os biológicos, bioquímicos e biomecânicos.

### **2.1.1. Remodelação óssea**

O crescimento ósseo é alcançado na idade jovem, pelo processo de modelação, e é mantido durante a vida adulta pelo processo de remodelação. A modelação óssea representa um processo adaptativo de crescimento ósseo generalizado e contínuo. Este



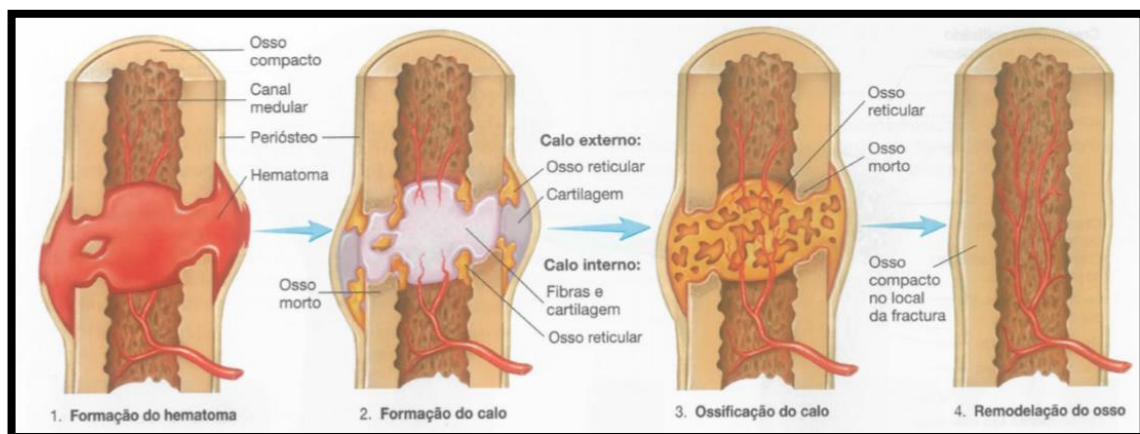
processo é regulado pelas atividades dos osteoblastos e osteoclastos, até que a estrutura do osso adulto seja conseguida [14].

Ao longo da vida, a remodelação fisiológica, remoção e substituição de osso, aproximadamente no mesmo local, ocorrem sem afetar a forma ou a densidade do osso, através de uma sequência de eventos, que incluem (i) a ativação de osteoclastos, (ii) a reabsorção do osso, (iii) a ativação de osteoblastos, e (iv) a formação de osso novo no local de reabsorção [16].

Quando ocorre uma fratura, além da descontinuidade do osso, existe também a perda da função e danos nos vasos sanguíneos. A lesão inicia uma cascata de eventos de cicatrização que podem ser descritos em três fases biológicas: inflamação, reparação e remodelação [17].

A resposta inflamatória inicial implica a formação de um hematoma no local dos vasos sanguíneos danificados. Os neutrófilos e macrófagos chegam e ingerem os detritos celulares da necrose enquanto libertam fatores de crescimento e citocinas. Estes sinais bioquímicos induzem a migração e diferenciação das células estaminais mesenquimais do osso circundante, medula, e periósteo. O crescimento capilar e a atividade dos fibroblastos criam o tecido de granulação fibrovascular no local da lesão [18].

A fase inflamatória é relativamente curta e é seguida pela fase de reparação, que começa com a formação dos osteoides, através dos osteoblastos, de maneira a formar novo tecido ósseo no local de defeito, denominado agora por calo ósseo. Aos poucos, a terceira fase de cicatrização, a remodelação, renova e reorganiza as fibras de colagénio, formando osso lamelar mecanicamente resistente [19].



**Figura 3 - Reparação do osso. (1) Formação de hematoma após uma fratura. (2) Formação do calo. O calo interno substitui o hematoma. O calo externo confere suporte. (3) Ossificação do calo. O osso esponjoso reticular substitui a cartilagem no calo interno e no calo externo. (4) A remodelação do osso substitui o osso reticular do calo ósseo e o osso morto adjacente ao local de fratura por osso compacto. A cura está completa [8].**

O osso apresenta, por isso, uma capacidade de promover a sua regeneração espontânea e remodelar a sua micro e macroestrutura, através de processos de osteogénese (formação do osso) e reabsorção óssea. Em caso de fratura ou doença este processo pode ser agilizado com o recurso a implantes.

### **2.1.2. Reconstrução de defeitos ósseos**

Existem vários métodos de reconstrução de defeitos ósseos, nomeadamente os enxertos autólogos, os alo-enxertos, a matriz óssea desmineralizada, as proteínas ósseas morfogenéticas, entre outros.

O enxerto ósseo é o segundo transplante de tecido mais comum em todo o mundo, com o objetivo de reparar defeitos ósseos em ortopedia, neurocirurgia e odontologia [20].

O enxerto ósseo autólogo é colhido a partir de locais específicos do esqueleto, como a crista ilíaca, e continua a ser o *gold standard*, e todas as outras formas de enxerto ósseo têm desvantagens em comparação com o enxerto autólogo [21]. Apesar da elevada eficácia desta técnica, os pacientes são sujeitos a um segundo local de cirurgia, o que pode aumentar a morbilidade, o tempo de internação hospitalar, a recuperação e o custo. Há também um maior risco de infeção das feridas e maior perda de sangue [22].

Os alo-enxertos são a alternativa mais utilizada para a colheita autógena. Contudo, esta opção apresenta um risco de transmissão de doenças, rejeição e reabsorção. O processamento destes tecidos diminui este risco, mas pode enfraquecer as propriedades biológicas e mecânicas inicialmente presentes no tecido ósseo [20].

Um implante biológico estimula as células mesenquimais indiferenciadas para se tornarem células osteoprogenitoras, formadoras de novo osso. Este fenómeno é conhecido por osteoindução. A matriz óssea desmineralizada deve o seu potencial osteoindutor às proteínas morfogenéticas ósseas [22].

Outra alternativa para o enxerto ósseo autólogo são os xeno-enxertos (ou enxertos heterólogos). Os xeno-enxertos são colhidos de um indivíduo e transplantados para outro indivíduo de espécie diferente. Os xeno-transplantes comuns são derivados de coral e também de origem suína e bovina. Uma das principais preocupações com produtos de origem bovina é a potencial transmissão de doenças e infeções. Os xeno-enxertos, à semelhança dos alo-enxertos, perdem as suas propriedades osteogénicas e parte das propriedades osteoindutoras durante o processamento (neutralização das propriedades antigénicas e prevenção de transmissão de infeção) [23].

Na Tabela 2 estão resumidas as vantagens e desvantagens dos enxertos ósseos, referidos anteriormente.

**Tabela 2 - Algumas vantagens e desvantagens dos três tipos de enxertos ósseos mais utilizados. Adaptado de [23].**

Enxerto ósseo	Vantagens	Desvantagens
<b>Auto-enxerto</b>	Ótimas propriedades osteogénicas, osteoindutoras e osteocondutoras, <i>gold standard</i> para enxerto ósseo, sem riscos de transmissão de doenças.	Dor e morbidade na zona dadora, quantidade e disponibilidade limitada, necessidade de outra cirurgia, hematoma, infeção, anestesia geral, período demorado de operatório, perda de sangue.
<b>Alo-enxerto</b>	Propriedades osteoindutivas e osteocondutivas, sem morbidade no local dador, anestesia local, elevada disponibilidade, fácil manuseio.	Ausência de propriedades osteogénicas, potencial resposta antigénica e transmissão de doenças, osteoindutividade variável, fornecimento limitado, perda de propriedades biológicas e mecânicas devido ao processamento, indisponibilidade mundial devido a preocupações religiosas e financeiras e aumento de custo.
<b>Xeno-enxerto</b>	Propriedades osteoindutivas e osteocondutivas, baixo custo, elevada disponibilidade.	Ausência de propriedades osteogénicas, risco de transmissão de doenças infecciosas, mau resultado.

A evolução tecnológica e a melhor compreensão da biologia no processo de cura do osso tem levado ao desenvolvimento de vários substitutos ósseos.

## 2.2. Engenharia de tecidos - *Scaffolds*

A ET é a opção 'final' na gestão da perda óssea. É definida como um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida para desenvolver substitutos biológicos que servem para restaurar, manter ou melhorar a função de um tecido. Esta requer a combinação, de uma forma integrada, de conhecimentos de várias áreas, tais como a física, a química, a engenharia, as ciências dos materiais, a biologia e a medicina [24].

Desde o seu aparecimento, em meados de 1980, a Engenharia de Tecidos tem continuado a evoluir como um campo multidisciplinar com o objetivo de restabelecer a estrutura e a função de um defeito, utilizando a resposta de cura natural do corpo associada ao tratamento com um ou mais dos três elementos seguintes: células, moléculas de sinalização e *scaffolds* (Figura 4) [4,17].

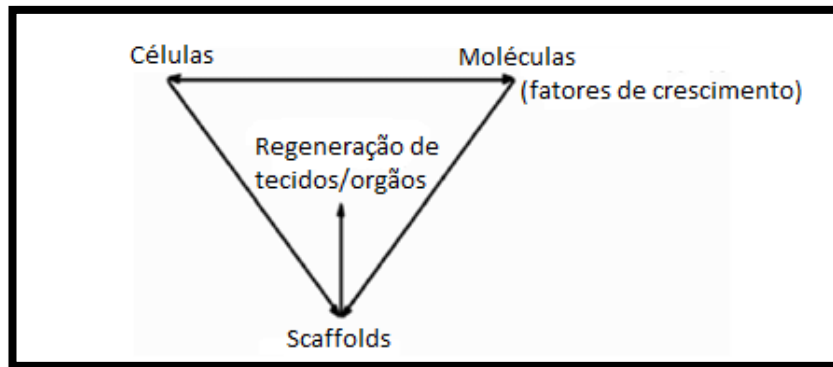


Figura 4 - Representação esquemática da função dos *scaffolds* em ET. Adaptado de [25].

O tratamento à base de células e fatores de crescimento fornece os componentes osteogênicos e osteocondutivos para o tratamento de uma lesão severa ou perda óssea [17]. No entanto, é necessário um *scaffold* para o enchimento do defeito ósseo e como veículo para as células e/ou fatores de crescimento utilizados no tratamento [26]. Além disso, um *scaffold* deve fornecer suporte mecânico temporário, osteocondutividade, uma arquitetura porosa, capacidade de degradação controlada, biocompatibilidade do mesmo e dos produtos de degradação, e estabilidade [26].

**Tabela 3 - Funções da matriz extracelular em tecidos nativos e de *scaffolds* em tecidos artificiais. Adaptado de [4].**

<b>Funções da matriz extracelular em tecidos nativos</b>	<b>Funções análogas dos <i>scaffolds</i> em tecidos artificiais</b>	<b>Características arquitetônicas, biológicas e mecânicas dos <i>scaffolds</i></b>
<b>Fornece suporte estrutural para as células residirem</b>	Fornece suporte estrutural para as células exogenamente aplicadas se anexarem, crescerem, migrarem e diferenciarem <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	Biomateriais com locais de ligação para as células; estrutura porosa com interligação para a migração celular e difusão de nutrientes; resistência temporária à biodegradação após implantação.
<b>Contribui para as propriedades mecânicas dos tecidos</b>	Fornece a forma e a estabilidade mecânica do defeito do tecido e oferece rigidez e dureza aos tecidos artificiais.	Biomateriais com propriedades mecânicas suficientes, que preenchem o espaço vazio do defeito e que simulam o tecido nativo.
<b>Fornece estímulos bioativos às células para responder ao seu microambiente</b>	Interage ativamente com as células para facilitar as atividades como a proliferação e diferenciação.	Sinais biológicos, tais como locais de ligação célula-adesivo; sinais físicos, tais como a topografia da superfície.
<b>Atua como reservatórios de fatores de crescimento e potencializa as suas ações</b>	Serve como veículo de entrega e reservatório de fatores estimuladores de crescimento exogenamente aplicados.	Microestruturas e outros fatores da matriz retêm agentes bioativos no <i>scaffold</i> .
<b>Fornece um ambiente físico flexível para permitir a remodelação em resposta a processos dinâmicos dos tecidos, tais como a cicatrização de feridas</b>	Fornece um volume vazio para vascularização e formação de tecido novo durante a remodelação.	Microestruturas porosas para difusão de nutrientes e metabolitos; desenho da matriz com mecanismos e taxas de degradação controláveis; biomateriais e os seus produtos de degradação com aceitável compatibilidade com os tecidos.

O *scaffold* deve ser a matriz extracelular do tecido alvo no seu estado nativo. Contudo, as múltiplas funções, a complexa composição e a natureza dinâmica da matriz extracelular em tecidos nativos faz com que esta seja difícil de imitar. O conceito de *scaffolds* em ET visa simular as funções da matriz extracelular, associados às suas propriedades biológicas e características mecânicas e arquitetônicas (Tabela 3).

O *scaffold* ideal deve proporcionar um ambiente adequado para o desenvolvimento do tecido: deve promover a fixação, o crescimento e a diferenciação das células, o crescimento ósseo, a revascularização *in vivo*, a osteointegração com o osso hospedeiro, e a substituição gradual do *scaffold* pelo osso recém-formado. Deve igualmente adaptar-se a um local irregular e/ou suportar carga mecânica. Finalmente, deve ser esterilizado (sem perda de propriedades), armazenado e implantado, sem qualquer efeito prejudicial no tecido circundante [27, 28].

Os *scaffolds* podem ser produzidos a partir de vários biomateriais e utilizando diferentes técnicas de fabrico, dependendo dos tecidos e órgãos a regenerar. Independentemente do tipo de tecido, há alguns aspetos fundamentais na conceção ou adequação de um *scaffold* para utilizar em ET:

### 1. Biocompatibilidade

Qualquer *scaffold* utilizado em ET deve ser biocompatível. Os biomateriais usados para o fabrico dos *scaffolds* têm de ser compatíveis com os componentes celulares dos tecidos artificiais e com as células endógenas do tecido hospedeiro. Os *scaffolds* devem fornecer suporte para as células se anexarem, crescerem e se diferenciam durante a cultura *in vitro* e a implantação *in vivo*. Após a implantação, o *scaffold* deve desencadear uma reação imunitária negligenciável, de modo a evitar uma resposta inflamatória grave que possa reduzir a cura ou causar a rejeição pelo corpo [29].

### 2. Biodegradabilidade

O objetivo da ET é permitir que as células do corpo, ao longo do tempo, substituam o *scaffold*. Estas estruturas não se destinam a implantes permanentes. Os *scaffolds* devem ser biodegradáveis, de modo a permitir que as células produzam a sua própria matriz extracelular. Os subprodutos desta degradação não devem ser tóxicos e devem ter a capacidade de sair do corpo, sem interferir com os outros órgãos. A degradação deve acontecer em paralelo com a formação de tecido, e para tal, é necessária uma resposta inflamatória combinada com uma infusão controlada de células (como os macrófagos) [30].

### 3. Bioatividade

Os *scaffolds* podem interagir ativamente com os componentes celulares para facilitar e regular as suas atividades. Os biomateriais podem incluir sinais biológicos ou estímulos físicos, tais como a topografia, para influenciar a morfologia celular e o alinhamento. O *scaffold* pode também servir como um veículo de libertação ou reservatório

para sinais de estimulação de crescimento exógenos, tais como fatores de crescimento, para acelerar a regeneração. Neste sentido, os biomateriais têm de ser compatíveis com as biomoléculas e suscetíveis de uma técnica de encapsulamento para libertação controlada de biomoléculas com a bioatividade bloqueada [4,31].

#### 4. Propriedades mecânicas

Os *scaffolds* proporcionam estabilidade mecânica ao defeito do tecido. Idealmente, o *scaffold* deve apresentar propriedades mecânicas compatíveis com o local anatómico para o qual será implantado e, a partir de um ponto de vista prático, deve ser forte o suficiente para permitir a manipulação cirúrgica durante a implantação. Para tecidos ósseos, o *scaffold* implantado deve ter uma integridade mecânica suficiente para funcionar a partir do momento da implantação até à conclusão do processo de remodelação [32]. É necessário um equilíbrio entre as propriedades mecânicas e a arquitetura porosa suficiente para permitir a infiltração das células e a vascularização [29].

#### 5. Arquitetura

A arquitetura dos *scaffolds* utilizados para a ET é de elevada importância. Os *scaffolds* devem proporcionar um volume vazio para a vascularização, formação de tecido novo e remodelação, de modo a facilitar a integração do tecido do hospedeiro após a implantação. Os biomateriais devem ser processados para se obter uma estrutura porosa suficiente para o transporte eficiente de nutrientes e metabolitos sem comprometer significativamente a estabilidade mecânica do *scaffold*. Além disso, é necessária uma estrutura porosa interligada para permitir a difusão dos resíduos para fora do *scaffold*, e a eliminação dos produtos de degradação da própria estrutura [33]. Outro aspeto importante é o tamanho médio dos poros, que devem ser suficientemente grandes para permitir que as células migrem para a estrutura, mas suficientemente pequenos para estabelecer uma superfície específica elevada [5]. O tamanho médio de poro pode variar consoante o tipo de células utilizadas e o tecido a ser manipulado. Para o crescimento interno do osso, são vários os valores apresentados por diferentes autores. O tamanho de poro deve variar entre 200-900  $\mu\text{m}$  [34–37]. A microporosidade (poros  $<10\ \mu\text{m}$ ) contribui para as propriedades biológicas (interações célula-material) e físico-químicas (resiliência mecânica e reabsorção) do material. Os macroporos (poros  $>50\ \mu\text{m}$ ) também se devem interligar para permitir a entrada das células a maior profundidade, a invasão vascular e a dissolução da matriz.

## 6. Tecnologia de fabrico

Para que um *scaffold* se torne clínica e comercialmente viável, deve ser rentável e passível de aumentar a escala de produção, a partir da produção individual num laboratório de investigação para a produção de pequenos lotes [29].

Todos os critérios listados acima são dependentes da escolha do biomaterial a partir do qual o *scaffold* deve ser fabricado.

## 2.3. Biomateriais

Um material bioativo é definido como um material que induz uma resposta biológica específica na interface que resulta na formação de uma ligação entre os tecidos e os materiais do implante. Uma característica comum de todos os implantes bioativos é a formação de uma camada de hidroxiapatite carbonatada (HCA) na sua superfície, quando implantados. A fase da HCA é equivalente em composição e estrutura à fase mineral do osso. As fibrilhas de colagénio são incorporadas dentro dos aglomerados, ligando, assim, a superfície do implante inorgânico aos constituintes orgânicos dos tecidos [38].

A escolha do material mais apropriado para a produção de uma estrutura de suporte para ser utilizada em aplicações de ET ósseo é um passo muito importante para a construção de um produto de engenharia de tecidos, uma vez que as suas propriedades vão determinar, em grande parte, as propriedades do *scaffold*. Até ao momento têm sido propostos vários materiais, tais como metais, cerâmicos e polímeros, tanto de origens naturais como sintéticas. No entanto, os metais e a maior parte dos materiais cerâmicos não são biodegradáveis, reduzindo a oferta para um pequeno número de cerâmicos e polímeros biodegradáveis [2,25].

No desenvolvimento de substitutos do osso é necessário um elevado nível de porosidade, uma vez que: (i) os materiais porosos têm uma grande área de superfície, o que resulta numa tendência elevada de bioreabsorção, o que induz uma grande bioatividade; e (ii) os poros interligados permitem o crescimento do tecido e, assim, possibilitam a fixação da prótese ao osso circundante, evitando a perda de implantes. A porosidade interligada atua como uma organização de canais vasculares, que assegura o fornecimento de sangue e a nutrição do osso. Para tal, é necessário que a dimensão da rede interligada seja, pelo menos, de 100 µm de diâmetro [38].



Os cerâmicos têm sido amplamente utilizados no campo da engenharia biomédica e substituição/regeneração do osso. A sua origem pode ser natural (por exemplo a HA coralina) ou sintética, tais como a HA sintética ou  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP). Por terem propriedades interessantes (osteocondutoras e osteoindutivas), estes materiais têm sido considerados para aplicações na engenharia de tecido ósseo [39].

A ligação dos tecidos a um implante está diretamente relacionada com a resposta tecidual na interface do implante. Existem quatro tipos de biocerâmicos, cada um com um tipo diferente de integração com o tecido [40]:

1. Quase inerte: o implante não se liga ao osso. Em vez disso, é formado tecido fibroso de modo a isolar o implante do hospedeiro. É um mecanismo de proteção e com o tempo pode levar à encapsulação completa de um implante no interior da camada fibrosa. Alumina, zircónia, metais e a maioria dos polímeros apresentam este tipo de resposta interfacial.
2. Poroso: o implante forma uma ligação mecânica através de crescimento interno de osso dentro dos poros. O crescimento do osso na porosidade da superfície proporciona uma grande área interfacial entre o implante e o seu hospedeiro, impedindo que o implante se solte. Este tipo de biocerâmico é capaz de resistir a tensões mais complexas do que os implantes anteriores (tipo 1). Um exemplo típico de implante poroso é a HA porosa.
3. Bioativo: o implante forma uma ligação com o osso através de reações químicas na interface. Uma característica comum a todos os implantes bioativos é a formação de uma camada de HCA na sua superfície, quando implantados. A espessura da camada de reação entre materiais diferentes varia de 0.5–100  $\mu\text{m}$ , provavelmente devido à diferença nas solubilidades. Exemplos de implantes bioativos incluem a HA e os vidros bioativos.
4. Reabsorvíveis: o implante degrada-se gradualmente com o tempo e é substituído pelo osso. Para uma aplicação bem-sucedida deste tipo de materiais, a taxa de reabsorção deve coincidir com a taxa de reparação dos tecidos do corpo, e o desempenho mecânico também deve ser compatível, enquanto a regeneração dos tecidos está a ocorrer. Exemplos de implantes reabsorvíveis incluem o fosfato tricálcico, vidros bioativos e polímeros especialmente formulados.

Apesar da HA ser utilizada frequentemente na cirurgia ortopédica (em forma de pó ou bloco monolítico), as suas fracas propriedades mecânicas impedem o seu uso em situações de suporte de carga [38].

### **2.3.1. Vidros bioativos**

Um dos materiais mais utilizados para a reparação de defeitos ósseos é a HA sintética, uma vez que é semelhante ao mineral do osso (HCA), e é bioativa e osteocondutora. A osteocondução é o crescimento de osso ao longo de um material a partir da interface osso-implante. A HA na forma porosa está comercialmente disponível, no entanto apresenta taxas muito baixas de reabsorção e, por isso, é utilizada para o aumento do osso (suporte mecânico do osso doente), e não para regeneração [41].

A alternativa para a HA sintética são os vidros bioativos, que podem cumprir a totalidade dos critérios exigidos para a seleção de materiais para um *scaffold*. São bioativos e formam uma ligação ao osso mais rápido do que outros cerâmicos bioativos [42]. Este material tem a capacidade de formar uma camada de apatite carbonatada na sua superfície, muito semelhante à apatite no osso, quando em contacto com um fluido fisiológico [43]. Os vidros bioativos têm a capacidade de estimular o crescimento de osso novo à medida que se dissolvem no corpo e são denominados de osteoindutivos. O seu comportamento osteogénico deve-se, provavelmente, à libertação de concentrações críticas de iões ativos que estimulam os genes com células osteogénicas [44].

Em 1969, o professor Larry Hench e os seus colaboradores, descobriram que o osso pode ligar-se quimicamente ao vidro com determinadas composições. Este grupo de vidros tornou-se conhecido como vidros bioativos, com base na seguinte definição: "um material bioativo é aquele que provoca uma resposta biológica específica na interface do material que resulta na formação de uma ligação entre o tecido e o material" [45]. Um dos aspetos que torna os vidros bioativos diferentes dos outros cerâmicos bioativos e vitrocerâmicos é a possibilidade de controlar uma gama de propriedades químicas e a taxa de ligação aos tecidos [45]. A base do processo de ligação do osso aos vidros bioativos é a reatividade química, pois são as reações químicas que ocorrem na superfície do biomaterial que possibilitam a formação de HCA. As cinco primeiras etapas ou reações ocorrem na interface na presença de água destilada ou SBF, e não necessita da presença de tecidos vivos [46]:

1. Troca rápida de íons alcalinos, como  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , com  $\text{H}^+$  e  $\text{H}_3\text{O}^+$ , entre o vidro e a solução;
2. Perda de sílica solúvel do vidro para a solução. Ocorre devido à dissolução da sílica da rede vítrea por ataque dos íons hidroxilo que provocam a quebra de ligações Si-O-Si e a formação de silanol (Si-OH);
3. Policondensação da camada rica em sílica na superfície do material;
4. Migração de grupos de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  do vidro para a superfície, através da camada rica em  $\text{SiO}_2$ . Formação de um filme amorfo rico em  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  (fosfato de cálcio amorfo) sobre a camada rica em sílica em poucos minutos, uma vez que os passos anteriores são rápidos;
5. Cristalização da camada amorfa rica em  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ . A cristalização desta camada dá-se por incorporação de  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{F}^-$ ;
6. Adsorção de proteínas específicas na camada de  $\text{SiO}_2\text{-HCA}$ ;
7. Ação de macrófagos;
8. Adesão e diferenciação celular;
9. Formação de matriz extracelular;
10. Mineralização da matriz.

O 45S5 Bioglass® é um dos primeiros materiais completamente sintéticos que se liga perfeitamente ao osso. Desenvolvido por Hench e pelos seus colegas, este vidro bioativo é composto por 45% de  $\text{SiO}_2$ , 6% de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , 24.5% de  $\text{CaO}$  e 24.5% de  $\text{Na}_2\text{O}$  (em % de peso). Estudos realizados por Hench mostraram que a superfície do 45S5 Bioglass®, em fluidos biológicos, se transforma a partir de uma composição rica em silicato para uma estrutura rica em fosfato, semelhante à HA [35,47]. Apesar deste vidro bioativo ter sido usado em numerosos programas clínicos e ter revelado capacidades de cura favoráveis, apresentou vários problemas, como sendo [48]: (i) a elevada taxa de dissolução nos fluidos fisiológicos; (ii) a diminuição da bioatividade; e (iii) o pH do meio muito alcalino (pH 9–10), afetando o equilíbrio da remodelação óssea e acelerando a reabsorção óssea.

Esta composição dificilmente pode ser transformada num *scaffold*, pois cristaliza na sinterização, formando um vitrocerâmico. Estes vidros apresentam excelentes propriedades bioativas, mas não na forma de *scaffolds* [41]. A principal razão para este sucesso limitado reside nas dificuldades encontradas durante o processamento dos pós de vidro bioativo 45S5 em estruturas porosas adequadas para a utilização como suportes para a regeneração óssea, isto é, com uma porosidade apropriada para a indução do

crescimento do osso e a integridade mecânica suficiente para serem manuseadas durante a implantação e, se possível, para substituir a função estrutural do osso durante todo o processo de regeneração dos tecidos [49].

O problema reside na estreita janela de sinterização (diferença de temperatura entre a temperatura de transição vítrea (~550 °C) e do início da cristalização (~610 °C)) associada às partículas de vidro 45S5, impedindo a ocorrência de densificação em grau apreciável antes da cristalização [50]. O intervalo de transição vítrea é a faixa de temperatura necessária para que ocorra a acomodação dos átomos na estrutura, e é denominada por região de transição/transformação vítrea. A transição vítrea é o fenómeno que caracteriza o estado vítreo, e então, os vidros podem ser definidos como um material não cristalino que apresenta o fenómeno de relaxamento estrutural, ou seja, temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). Propriedades como a taxa de dissolução e a resistência mecânica de vidros diferentes podem ser comparadas com a ajuda da  $T_g$  [51]. A  $T_g$  e a temperatura do pico de cristalização são duas propriedades muito importantes de um vidro. Se um vidro bioativo cristaliza, torna-se menos bioativo porque a troca de iões entre o vidro e a solução aquosa é contrariada pelas fases cristalinas [47].

O fabrico de *scaffolds* porosos de pó de vidro bioativo 45S5 através de métodos de processamento tradicionais é feito usando altas temperaturas de sinterização (~1000 °C), onde o material é quase totalmente cristalino [52,53]. Infelizmente, a bioatividade destas estruturas cristalizadas é retardada: o início da formação da apatite em fluido fisiológico simulado (SBF) aumenta de 10 horas para 22–25 horas [49].

As sérias limitações do 45S5 Bioglass®, mencionadas anteriormente, originaram uma investigação realizada pelo Professor Doutor José Maria Ferreira e pelo Doutor Ashutosh Goel, com vista a encontrar uma solução melhor para a produção de materiais de enxerto ósseo. O FastOs®BG surge como resultado desta investigação, realizada na Universidade de Aveiro [54], e diz respeito a um conjunto de composições de vidros/vitrocerâmicos bioativos capazes de desenvolver uma camada superficial de HA ao fim de uma hora de imersão em SBF [55]. Tais composições podem incluir fluoretos, e uma variedade de óxidos (ou compostos seus precursores), tais como  $\text{Na}_2\text{O}$ – $\text{Ag}_2\text{O}$ – $\text{SrO}$ – $\text{CaO}$ – $\text{MgO}$ – $\text{ZnO}$ – $\text{P}_2\text{O}_5$ – $\text{SiO}_2$ – $\text{Bi}_2\text{O}_3$ – $\text{B}_2\text{O}_3$ – $\text{CaF}_2$ , serem preparadas por fusão ou pelo processo sol-gel, sendo a composição específica e o método de preparação selecionados de acordo com as funcionalidades pretendidas, podendo apresentar taxas de biodegradação controladas e atividade antibacteriana [56].

Quando comparado com outros biovidros, o FastOs®BG apresenta [54,56]: (i) uma capacidade excepcionalmente elevada de formação de uma camada de HA quando imerso em SBF, indiciadora de uma rápida ligação aos tecidos ósseos; (ii) solubilidade mais baixa, propriedade que permite que a camada de HA apresente forte adesão; (iii) variações de pH muito moderadas quando em contacto com os fluidos fisiológicos; (iv) uma taxa de degradação inferior (menos de metade); e (v) excelente sinterabilidade. Estas propriedades tornam o FastOs®BG muito atrativo para o fabrico de *scaffolds* aumentando a oferta atual de vidros e vitrocerâmicas disponíveis para aplicações clínicas.

Desde o desenvolvimento do 45S5 Bioglass®, os vidros bioativos têm sido considerados uma excelente alternativa para os fosfatos de cálcio nas aplicações de reparação óssea. A sua rápida degradação e conversão para HA *in vitro* e *in vivo* pode promover a adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos, e, eventualmente, a vascularização e o crescimento ósseo através da expressão génica desencadeada pelos seus produtos de degradação [57].

Atualmente existem vários vidros e vitrocerâmicos disponíveis para aplicações clínicas (Tabela 4) [35]. Uma característica comum entre os vidros bioativos e os vidros cerâmicos é a modificação cinética da superfície, em função do tempo, que ocorre após a implantação. A superfície forma uma camada de apatite carbonatada biologicamente ativa, responsável pela ligação com os tecidos. Esta interface aderente aos tecidos resiste a forças mecânicas consideráveis. Em muitos casos, a força de adesão é equivalente ou superior à força coesiva do material do implante ou da ligação do tecido ao implante bioativo [45].

**Tabela 4 - Composição de vitrocerâmicos e vidros bioativos (em percentagem de peso). Adaptado de [35].**

Componente	Vidro e vitrocerâmico									
	45S5 Bioglass	45S5F Bioglass	45S5.4F Bioglass	40S5B5 Bioglass	52S4.6 Bioglass	55S4.3 Bioglass	KGC Ceravital	KGS Ceravital	KGy213 Ceravital	A-W GC
SiO <sub>2</sub>	45	45	45	40	52	55	46.2	46	38	34.2
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	6	6	6	6	6	6				16.3
CaO	24.5	12.25	14.7	24.5	21	19.5	20.2	33	31	44.9
Ca(PO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>							25.5	16	13.5	
CaF <sub>2</sub>		12.25	9.8							0.5
MgO							2.9			4.6
MgF <sub>2</sub>										
Na <sub>2</sub> O	24.5	24.5	24.5	24.5	21	19.5	4.8	5	4	
K <sub>2</sub> O							0.4			
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>									7	
B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>				5						
Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /TiO <sub>2</sub>									6.5	

Os vidros bioativos têm uma ampla gama de aplicações, ajudam na reparação de tecidos duros [6] e atualmente são utilizadas várias composições para a preparação de *scaffolds* e também como material de revestimento para implantes [47].

## 2.4. Técnicas de processamento

O próximo passo após a seleção do biomaterial é escolher, ou desenvolver, uma técnica de processamento adequado. Para ter a certeza de que todos os requisitos dos *scaffolds* são cumpridos, a técnica de processamento escolhida deve obedecer, em termos gerais, aos seguintes critérios [2]:

1. A metodologia de processamento não deve prejudicar as propriedades dos materiais, ou seja, as suas propriedades químicas ou de biocompatibilidade;
2. A técnica deve ser precisa e consistente, em relação à porosidade, tamanho dos poros, distribuição dos poros e a sua interligação;
3. Diferentes conjuntos de *scaffolds* devem apresentar variações mínimas nas suas propriedades, quando processados a partir do mesmo conjunto de parâmetros e condições de processamento.

Os métodos propostos para a preparação de *scaffolds* com uso de materiais poliméricos ou cerâmicos, e porosidade adequada à sua aplicação, são variados. A sua aplicação em vidros é contudo mais recente.

Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente no fabrico de estruturas tridimensionais porosas com funcionalidades complexas, não só para o uso em engenharia de tecidos, mas também para outras aplicações (como a geração de energia, eletrónica, etc.) [58].

As técnicas ideais de *design* e fabrico dos *scaffolds* devem ser capazes de criar estruturas porosas adequadas para atingir a função mecânica e as propriedades de transporte de massa (propriedades de permeabilidade e de difusão) desejadas. As técnicas designadas por convencionais têm sido tradicionalmente utilizadas para a síntese de estruturas porosas [59]. Contudo, estas técnicas apresentam várias desvantagens, como a necessidade de ferramentas e moldes específicos, pobre reprodutibilidade, a dificuldade de controlar com precisão o tamanho dos poros e a interligação, a geometria, a distribuição espacial, para criar canais internos dentro do *scaffold* para a vascularização, e consequentemente, propriedades mecânicas pobres e imprevisíveis (Tabela 5) [58,60].

Tabela 5 - Vantagens e desvantagens de diferentes técnicas de fabrico. Adaptado de [59].

Técnicas	Vantagens	Desvantagens
<b><i>Solvent casting/ Particulate leaching</i></b>	Controlo da porosidade, tamanho de poro e cristalinidade.	Propriedades mecânicas limitadas, resíduos de solvente e material porogénio.
<b><i>Porogen leaching</i></b>	Controlo da porosidade e geometria dos poros.	Interligação e tamanho de poro inadequados.
<b><i>Gas foaming</i></b>	Livre de solventes orgânicos agressivos, controlo da porosidade e tamanho de poro.	Propriedades mecânicas limitadas, interligação dos poros inadequada.
<b><i>Phase separation</i></b>	Sem diminuição na atividade da molécula.	Dificuldade em controlar com precisão a morfologia do <i>scaffold</i> .
<b><i>Fiber mesh</i></b>	Área superficial elevada para a adesão celular, rápida difusão de nutrientes.	Falta de estabilidade estrutural

<b><i>Melt molding</i></b>	Controlo independente da porosidade e tamanho dos poros.	Temperatura elevada para polímeros não amorfos.
<b><i>Freeze drying</i></b>	Não é necessária uma temperatura elevada nem a etapa de lixiviação.	Tamanho de poro pequeno e longo tempo de processamento.

Os novos métodos para o fabrico de materiais à escala micro e nano têm levado a avanços científicos e tecnológicos nas áreas da ciência dos materiais, química, física e biologia. A grande diversidade de materiais potencialmente relevantes, escalas de comprimento e arquiteturas, reforçam a necessidade de abordagens de modelação flexível [61]. Atualmente, as técnicas de fabrico aditivo são uma maneira eficiente para fabricar os *scaffolds* com as propriedades desejadas e com uma arquitetura altamente reprodutível [59]. Estas técnicas fornecem os meios para superar os obstáculos referidos anteriormente, com a capacidade de produção de *scaffolds* com forma personalizada e morfologia interna reprodutível e pré-definida, sem a necessidade de maquinaria posterior.

As tecnologias de fabrico aditivo (*3-D printing, stereolithography, fused deposition modeling, robocasting, phasechange jet printing, etc.*) envolvem a construção de objetos 3-D a partir de um modelo de CAD, utilizando estratégias de fabrico em camadas [60]. Estas técnicas apresentam a capacidade para controlar a arquitetura da matriz (tamanho, forma, interligação, ramificação, geometria e orientação), proporcionando uma estrutura biomimética. É ainda possível controlar a propriedade mecânica, os efeitos biológicos e a cinética de degradação dos *scaffolds* [62,63].

Estas técnicas têm a vantagem adicional de os dados médicos obtidos a partir de tomografia computadorizada (TC) ou imagiologia de ressonância magnética (MRI) poderem ser usados para criar o modelo CAD e, conseqüentemente, a forma externa do *scaffold* correspondente ao local de tecido danificado. Além disso, estas técnicas podem ainda ser usadas para o fabrico de estruturas com combinações de materiais diferentes, criando gradientes microestruturais e químicos [59,60].



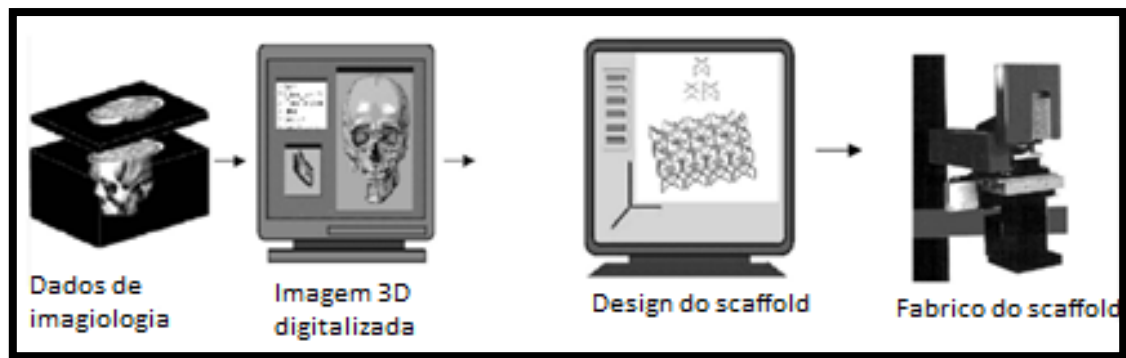


Figura 5 - Ilustração gráfica de um conceito de construção de um *scaffold* 3-D personalizado. Adaptado de [62].

#### 2.4.1. Robocasting

A técnica de *robocasting* consiste na deposição robótica, através de um orifício estreito, de pastas (tintas) derivadas de suspensões coloidais altamente concentradas. O comportamento reológico precisa ser ajustado de modo a que os cilindros extrudidos sejam capazes de suportar totalmente o seu próprio peso durante o processo de montagem. Assim, as linhas de tinta são estabelecidas de forma controlada para construir uma estrutura 3-D, camada por camada, seguindo um modelo de CAD [64]. A posição da ponta, imersa num banho de óleo não molhável para evitar a evaporação da água, é controlada pelo software de acordo como o modelo CAD. Esta técnica supera as limitações dos métodos de fabrico mais convencionais de *scaffolds*, permitindo o fabrico de estruturas com formas 3-D personalizadas e complexas [65].

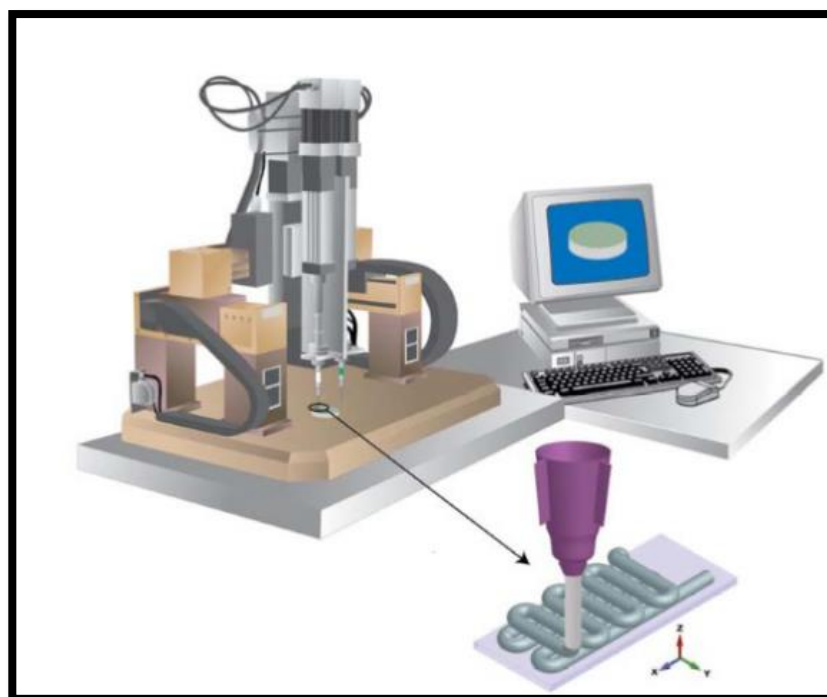


Figura 6 - Esquema ilustrado do equipamento de robocasting [66].

Os *scaffolds* com uma arquitetura dos poros orientada apresentam uma melhor resistência à compressão (ao longo da direção da orientação dos poros) que os *scaffolds* com uma arquitetura de poros aleatória. O *robocasting* proporciona uma maior facilidade para a produção de suportes de vidro com poros orientados [67].

O *robocasting* permite a produção de estruturas porosas ótimas para atingir o comportamento mecânico pretendido e as propriedades de transporte de massa (permeabilidade e propriedades de difusão) para as aplicações dos *scaffolds*. Uma característica que distingue o *robocasting* de outras técnicas de fabrico aditivo, é a utilização de tintas à base de água com um baixo teor de matéria orgânica e o facto de não necessitar de qualquer material de suporte ou molde [68,69]. Uma vez que o uso de quantidades consideráveis de ligantes noutras técnicas complicam os processos de sinterização e densificação, o *robocasting* aparece como uma tecnologia promissora para a construção (ou seja, impressão) de *scaffolds* cerâmicos [65].

#### 2.4.2. Estabilidade coloidal

A presença de cargas à superfície das partículas, como resultado da ionização/hidratação superficial e/ou da adsorção específica de espécies carregadas, afeta

a distribuição de íons na sua vizinhança, aumentando a concentração de íons de carga de sinal contrário junto à superfície e diminuindo a concentração de íons de carga do mesmo sinal, conduzindo assim à formação de uma dupla camada elétrica à volta das partículas [70,71]. A quantidade de trabalho necessária para agregar duas partículas com carga depende do potencial elétrico das mesmas, sendo que quanto maior este for, menor será a probabilidade de ocorrer agregação. Assim, o fator importante não é a carga das partículas mas sim o potencial relacionado com a organização das cargas na superfície e os respetivos contra-íons [72,73]. Este fenómeno é ilustrado esquematicamente na Figura 7.

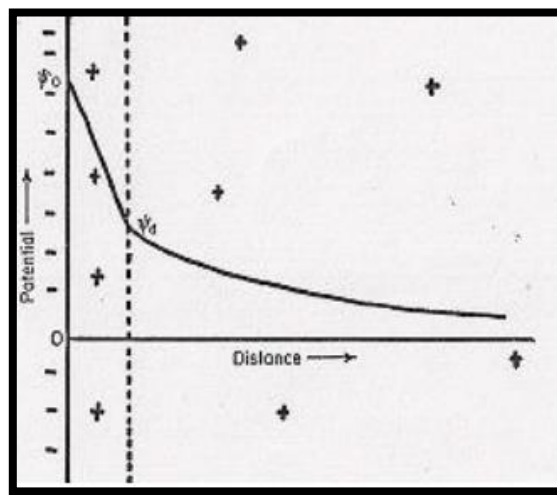


Figura 7 - Distribuição de contra-íons à superfície de uma partícula [73].

Quando as partículas eletricamente carregadas são submetidas a um campo elétrico, movem-se em direção ao eletrodo de polaridade oposta à carga superficial, com uma velocidade proporcional ao campo elétrico aplicado, fenómeno denominado por eletroforese. Ao movimentar-se, a partícula leva consigo os íons que se encontram mais fortemente ligados, deixando para trás aqueles com ligações mais fracas. O potencial elétrico no plano de deslizamento entre essa unidade em movimento e o meio circundante é denominado de potencial zeta [70,71].

As forças atrativas de Van der Waals são normalmente balanceadas por forças repulsivas de longo alcance, que podem ser originadas a partir das cargas de partículas em suspensão, ajustando o pH ou, mais frequentemente, pela adsorção superficial dos agentes superficialmente ativos, ou seja, dispersantes. Os dispersantes estabilizam as suspensões cerâmicas alterando a natureza da superfície e/ou as propriedades de carga

de superfície. A eficácia da estabilização depende do tipo de mecanismo que gera as forças de repulsão entre as partículas, que podem ser electroestáticas, estéreas ou eletroestéreas.

A estabilização eletroestática deriva da interação entre as duplas camadas elétricas. Quando um pó é disperso num líquido, forma-se imediatamente uma nuvem de cargas elétricas ao redor de cada partícula. Esta nuvem de cargas dá origem à dupla camada elétrica, que se caracteriza por uma camada de iões adsorvida sobre a partícula, devido à atração electroestática e uma segunda camada mais externa e difusa de contra-iões, projetada para o meio da solução [74]. Quando duas partículas se aproximam, a presença da dupla camada elétrica faz com que ocorra uma força repulsiva. Quando esta força supera a atração das forças de Van der Waals, sempre presentes, ocorre a estabilização eletrostática da suspensão, mantendo-se as partículas distantes umas das outras, reduzindo assim a atuação das forças de atração [75].

A adsorção de moléculas poliméricas sobre a superfície das partículas leva à estabilização estérea. A adsorção de polieletrólitos (polímeros que apresentam grupos funcionais ionizáveis na sua estrutura) à superfície das partículas também interpõe uma barreira de natureza estérea à sua aproximação, contribuindo para a estabilização da suspensão através do mecanismo estéreo [76].

Devido à importância das interações específicas, foram realizadas numerosas tentativas para as quantificar, incluindo os trabalhos pioneiros de Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek, conhecida como teoria DLVO. De acordo com esta teoria, a estabilidade coloidal de um sistema pode ser vista como a resultante de uma competição entre as forças atrativas de Van der Waals e as repulsivas de origem eletrostática (dupla camada elétrica). Sendo de grande utilidade na compreensão dos fenómenos relacionados com a estabilidade coloidal, esta teoria DLVO não considera a ação exercida pelas espécies macromoleculares de origem polimérica ou polieletrólita (com grupos funcionais ionizáveis) adsorvidas à superfície das partículas [77]. Esta adsorção modifica a carga elétrica superficial, exercendo um efeito mais complexo no potencial zeta. A adsorção de espécies aniónicas desloca o ponto isoelétrico (PIE) para valores de pH mais baixos, enquanto a adsorção de espécies catiónicas desloca o ponto isoelétrico em sentido oposto na escala de pH. O valor do potencial zeta é uma medida da estabilidade cinética de um sistema coloidal. Se todas as partículas em suspensão apresentarem um valor muito negativo (ou positivo) para o potencial zeta, então as partículas terão tendência para se repelirem mutuamente. Se, pelo contrário, as partículas apresentarem um valor baixo para o potencial zeta, então não haverá força repulsiva suficiente que previna a floculação das

partículas. Geralmente, as partículas com potencial zeta superior a 30 mV ou inferior a -30 mV são consideradas cineticamente estáveis. O potencial zeta pode ser determinado experimentalmente, sendo de grande utilidade na compreensão dos fenómenos que envolvem interações electroestáticas [71,75].



# Capítulo 3

---

## Procedimiento Experimental





### 3. Procedimento Experimental

O trabalho experimental foi dividido em 3 partes principais. Inicialmente preparou-se o vidro bioativo de referência TCP-20, por fusão e vazamento em água fria, e posterior secagem, calcinação e moagem. O vidro moído foi utilizado para a preparação de suspensões e pastas, posteriormente, tendo em conta as variáveis que influenciam o seu comportamento reológico. A partir da pasta com melhores características foram produzidos os *scaffolds*. As estruturas obtidas foram caracterizadas após a etapa de sinterização.

#### 3.1. Preparação e caracterização do vidro bioativo

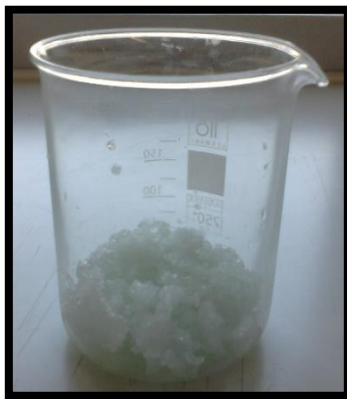
Para a preparação do vidro bioativo TCP-20 com a composição molar 38.49%SiO<sub>2</sub>–36.07%CaO–19.24%MgO–5.61%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>–0.59%CaF<sub>2</sub>, foram utilizados pós de matérias-primas de elevada pureza indicadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Matérias-primas utilizadas no fabrico do vidro bioativo.

Matérias-primas	Marca comercial	Pureza
CaCO <sub>3</sub>	M1 (Mineraria Sacilese, Italy)	≥ 99%
SiO <sub>2</sub>	P500 (Sibelco)	≥ 99%
NH <sub>6</sub> PO <sub>4</sub>	Riedel-de Haen	≥ 99%
MgO	Sigma-Aldrich	≥ 98%
CaF <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich	≥ 99,9%

Efetuuou-se a homogeneização a seco de 90 g da mistura das matérias-primas num jarro de porcelana com bolas de nitreto de silício durante 10 minutos. Procedeu-se à calcinação da mistura em cadinhos de alumina durante 1 hora a 900°C, com uma taxa de aquecimento de 2°C·min<sup>-1</sup>, e posteriormente à fusão do vidro em cadinhos de platina a 1580°C durante 1 hora, com uma taxa de aquecimento de 10°C·min<sup>-1</sup>. Após a fusão, o líquido foi vazado em água fria, de modo a evitar a cristalização superficial, obtendo-se as fritas (Figura 8). As fritas arrefecidas em água fria foram colocadas a secar numa estufa a 100°C e mais tarde moídas a seco no moinho planetário (Retsch PM 400), em cubas de

ágata, a elevada velocidade (200 rpm), durante 2 horas. Após este processo, obtiveram-se pós com tamanho médio de partícula de 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 8 - Frita do vidro bioativo TCP-20.**

Com o tamanho de partícula obtido não foi possível preparar uma suspensão estável e homogênea, ocorrendo a sedimentação de partículas. Com recurso a estudos de reologia, verificou-se que o comportamento da suspensão não estava otimizado para a utilização no *robocasting*, devido ao elevado tamanho médio das partículas. Posto isto, procederam-se a etapas posteriores de moagem por via húmida até se conseguirem obter pós mais finos de vidro bioativo com um tamanho de partícula adequado para a preparação de suspensões fluidas e concentradas. Os pós obtidos anteriormente foram moídos em etanol, no moinho de rolos, obtendo-se um tamanho médio de partícula de 7  $\mu\text{m}$ . Uma vez que não se verificou uma redução significativa do tamanho de partícula no moinho de rolos, recorreu-se posteriormente a uma moagem em moinho de atrito, energeticamente mais eficaz na redução do tamanho de partícula. Para tal, os pós foram inicialmente peneirados (<40  $\mu\text{m}$ ) e posteriormente sujeitos a moagem no moinho de atrito durante 2 horas a 750 rpm. Posteriormente, a suspensão foi seca numa estufa de 100°C, durante 1 dia, e obtiveram-se pós com tamanho médio de partícula de 4  $\mu\text{m}$ . Aumentando o tempo de moagem para 12 horas à mesma rotação (750 rpm) foi possível reduzir o tamanho médio de partícula dos pós de vidro para 1  $\mu\text{m}$ . Os pós resultantes foram novamente peneirados (<40  $\mu\text{m}$ ) de modo a eliminar os aglomerados resultantes do processo de secagem.

A avaliação da distribuição do tamanho das partículas do vidro ao longo das várias etapas de moagem foi efetuada num equipamento Coulter LS230 (Figura 9), utilizando o modelo ótico de Fraunhofer.



Figura 9 - Equipamento de análise do tamanho de partícula, Coulter LS230.

### 3.1.1. Caracterização cristalográfica

A natureza amorfa do vidro (ausência de fases cristalinas) foi confirmada por análise de difração de raios-X (DRX), após desagregação num almofariz de ágata. A caracterização cristalográfica da frita foi efetuada num difractómetro Rigaku Geigerfle D/Max-SérieC, equipado com um monocromador curvo de grafite, com uma voltagem de 40 kV e uma corrente de 30 mA, usando a radiação  $K\alpha$  ( $\lambda=1,54056 \text{ \AA}$ ).

### 3.1.2. Análise morfológica

A análise morfológica dos pós de vidro foi efetuada por microscopia eletrónica de varrimento (SEM), num microscópio HITACHI, modelo S-4100 (Figura 10-a) provido de um sistema de emissões de eletrões com um filamento de tungsténio com potencial de aceleração de 10 kV e resolução máxima de 15  $\text{\AA}$ . Para a observação dos pós de vidro utilizou-se uma gota de suspensão de pó depositada numa lamela de vidro, suportada num porta-amostras de alumínio, plano e polido, e seguidamente seca em estufa a 40 °C. A amostra foi revestida com um filme fino de carbono, por deposição, no equipamento EMITECH K950X (Figura 10-b).



Figura 10 - a) Microscópio eletrônico de varrimento; b) Depositador de carbono.

### 3.1.3. Análise Térmica Diferencial e Termogravimétrica

As análises térmica diferencial (ATD) e termogravimétrica (ATG) do vidro foram efetuadas num equipamento Seteram Labsys DTA/TG-DSC, com uma velocidade de aquecimento de 10°C/min, desde 25 a 1000°C. Estas análises tiveram como objetivo identificar a natureza das reações que podem acontecer no aquecimento e as temperaturas relevantes a que ocorrem as principais transformações, e investigar a variação de massa deste material em função do aumento da temperatura.

## 3.2. Preparação e caracterização das suspensões

Para a estabilização e preparação das suspensões concentradas de vidro bioativo em meio aquoso, foi feito um estudo de estabilização prévio, utilizando diferentes dispersantes: Targon 1128 (BK Giulini, Alemanha), Duramax D-3005 (Dow Chemical Company, EUA), Dispex A40 (Allied Colloids, Reino Unido), Darvan 821A (R.T. Vanderbilt Company, Inc., USA) e TMAH (Sigma-Aldrich, USA).

Para selecionar o dispersante mais adequado na estabilização das partículas de vidro bioativo, inicialmente foram feitos testes de sedimentação em provetas para os pós sem dispersante e na presença de 0.5 e 1 wt.% dos diferentes dispersantes (Targon 1128, Duramax D-3005, Dispex A40, Darvan 821A e TMAH). Para o efeito, prepararam-se 11 provetas (10 ml) com 0.2 g de pó de vidro, água desionizada e os referidos dispersantes. Foi feito o registo da observação das provetas em 3 tempos diferentes (2h30m, 5h30m e 21h30m).

Após esta observação inicial, selecionaram-se três dispersantes que mostraram os melhores resultados (Targon 1128, Dispex A40 e Darvan 821A), isto é, os que deram

origem a menores velocidades de sedimentação das partículas e procedeu-se ao estudo com testes reológicos para estes dispersantes selecionados. Para tal, prepararam-se suspensões à base de vidro bioativo TCP-20 em meio aquoso contendo 45 vol.% de sólidos com 0.5 e 1 wt.% de Targon 1128, 0.5 e 1 wt.% de Dispex A40 e 0.5 wt.% de Darvan 821A.

As suspensões foram sujeitas a um processo de desaglomeração numa misturadora (THINKY, Japão) durante 2 ciclos de 10 minutos a 900 rpm, obtendo-se consequentemente uma suspensão mais homogénea e livre de aglomerados. A caracterização reológica das suspensões foi efetuada num reómetro rotacional (Kinexus, Malvern, Reino Unido) com geometria cone e prato (4°, 40 mm) e gap 150 µm. Foram efetuadas medidas de escoamento (viscosidade em função da velocidade de corte) à temperatura ambiente na gama de velocidades de corte 0.1–500 s<sup>-1</sup>. Deste estudo verificou-se que o Targon 1128 era o dispersante mais adequado para a estabilização das partículas de TCP-20, tendo-se por isso efetuado medidas de viscosidade para 0.4 e 0.6 wt.% deste dispersante de forma a obter a concentração mais adequada para estabilizar a suspensão. Na Tabela 7 estão resumidos os dispersantes e as quantidades estudadas na preparação de suspensões concentradas (45 vol.% de sólidos) de TCP-20, com tamanho médio de partícula de 1 µm.

**Tabela 7 - Dispersantes testados e respetivas quantidades.**

<b>Dispersante</b>	<b>wt.%</b>
<b>Targon 1128</b>	0.4
	0.5
	0.6
	1
<b>Dispex A40</b>	0.5
	1
<b>Darvan 821A</b>	0.5

Posteriormente, foram feitas medidas de potencial zeta (Malvern Zeta sizer, Worcestershire, Reino Unido) para os pós sem dispersante e na presença de 0.5 wt.% de Targon 1128. Para o efeito prepararam-se suspensões *stock* contendo 1 wt.% de sólidos em água desionizada. Desta suspensão foram retirados 1 ml e diluídos em 100 ml de solução aquosa de KCl 10<sup>-3</sup> M, de modo a manter a força iónica constante em todos os

ensaios. Esta suspensão foi dividida em duas partes iguais para medição do potencial zeta, onde se ajustaram os valores de pH ácidos ou básicos, com soluções de HCl 0.1 M e NaOH 0.1 M, respetivamente. Avaliou-se, depois, a variação do potencial zeta na presença e ausência de dispersante.

Com base no comportamento reológico das suspensões concentradas de vidro bioativo em meio aquoso, preparadas com TCP-20 com tamanho médio de partícula de 1  $\mu\text{m}$ , procedeu-se à mistura de vidro bioativo com diferentes tamanhos médios de partícula (Tabela 8), de modo a melhorar o empacotamento das partículas e, consequentemente, o comportamento reológico as suspensões.

**Tabela 8 - Resumo das diferentes misturas de tamanhos de partícula testadas.**

<b>4 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>10 <math>\mu\text{m}</math></b>
40%	60%
<b>1 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>4 <math>\mu\text{m}</math></b>
30%	70%
50%	50%
75%	25%

### 3.3. Preparação e caracterização das pastas

Após a seleção do dispersante e da quantidade mais adequada, e também da distribuição de tamanho das partículas de vidro, procedeu-se ao estudo da adição dos diferentes aditivos: HPMC (Sigma-Aldrich, USA), PEI (Sigma-Aldrich, USA), Aristoflex® TAC (LEMEL S.A, Espanha) e CMC-250 (Mw=250 000, Lamberti Iberia S.A.U., Espanha), e concentrações dos mesmos, com o objetivo de verificar qual destes aditivos, ou combinação de aditivos, e respetivas quantidades, melhor se adequavam à obtenção de uma pasta concentrada e capaz de ser extrudida.

Inicialmente, estudou-se o HPMC como agente ligante, para aumentar a viscosidade da suspensão. A uma suspensão aquosa de TCP-20 com 45 vol.% de sólidos, preparada com uma mistura de partículas 50-50 (1  $\mu\text{m}$  e 4  $\mu\text{m}$ ) e com 0.5 wt.% de Targon 1128, adicionou-se 1 e 2 wt.% de HPMC preparado em meio aquoso. A concentração de sólidos foi reduzida para 43 vol.% após a adição. Foram registadas as medidas de fluxo para as 3 suspensões (na ausência e na presença de HPMC).

Após a seleção da concentração de HPMC mais adequada ao sistema, começou por se adicionar 0.2 wt.% de PEI, para colapsar as cadeias aniónicas do dispersante e flocular o sistema. Com a adição do PEI, a concentração de sólidos presentes na suspensão foi reduzida para 40 vol.%. Não se observando alterações na floculação da suspensão, aumentou-se gradualmente a quantidade de PEI até uma concentração de 2.28 wt.%, não se obtendo resultados satisfatórios. Desta forma, como agente floculante, o PEI não resultou neste sistema. Esta ineficácia é atribuída ao seu fraco grau de dissociação ao pH relativamente elevado da suspensão (pH  $\approx$  9).

Nestas circunstâncias, testou-se o Aristoflex® TAC como um floculante alternativo. A uma suspensão com 45 vol.% de sólidos e 0.5 wt.% de Targon 1128 adicionaram-se diferentes teores de Aristoflex® TAC (1, 2 e 3 wt.%) relativamente. Depois de analisar os resultados dos testes reológicos realizados com estas suspensões, decidiu-se preparar uma suspensão com 47 vol.% de sólidos, 0.5 wt.% de Targon 1128, 2 wt.% de HPMC e adicionou-se o Aristoflex® TAC numa gama de concentrações mais estreita (0.5, 1, e 1.25 wt.%) para averiguar as condições mais propícias à obtenção de uma pasta passível de ser extrudida no *robocasting*.

Outra opção a explorar na preparação de suspensões, e posteriormente pastas, à base de vidro bioativo, para a fabricação aditiva de *scaffolds*, é a utilização de um aditivo único. A carboximetilcelulose (CMC) é um modificador reológico muito versátil e proporciona várias propriedades importantes para as suspensões. As fortes características

hidrofílicas do CMC faz com que este aditivo seja um agente eficiente na retenção de água [78]. O CMC-250 foi utilizado como dispersante, ligante e floculante.

Prepararam-se suspensões com diferentes concentrações de sólidos e de CMC-250 (Tabela 9).

**Tabela 9 - Vol.% de sólidos e wt.% de CMC-250 utilizados na preparação das suspensões.**

<b>Vol.% de sólidos</b>	<b>Wt.% de CMC-250</b>
<b>40</b>	3
<b>45</b>	1
	2
<b>48</b>	2
<b>50</b>	1

Na Tabela 10 estão resumidas as concentrações dos diferentes aditivos estudados, a fim de se obter uma pasta otimizada para o fabrico de *scaffolds* através de *robocasting*.



Tabela 10 - Tipos de aditivos e concentrações testadas.

Vol.% de sólidos	wt. %				
	Targon	TAC	HPMC	CMC-250	PEI
40	0.5		2		
	0.5		2		0.2
				3	
43	0.5		1		
	0.5		2		
	0.5		2		0.2
45	0.5	0.05			
	0.5	0.1			
	0.5	0.25			
	0.5	0.5			
	0.5	1			
	0.5	2			
	0.5	3			
		0.5	2		
	0.5	1	2		
				1	
				2	
	0.1			1	
			2	1	
47			2	1	
	0.5	0.5	2		
	0.5	1	2		
	0.5	1.25	2		
48				2	
50				1	
			2	1	
52	0.1			1	
53	0.1			1	
	0.1		2	1	

Os efeitos das quantidades adicionadas de ligante e de flocculante no comportamento de gelificação das suspensões foi avaliado através de medidas reológicas em modo oscilatório (Kinexus, Malvern, Reino Unido) à temperatura ambiente, com varrimentos de tensão de corte entre 0.1 – 100 Pa para determinar a região de viscoelasticidade linear, a uma frequência de oscilação fixa de 1 Hz. Os tempos de adição e mistura dos aditivos, e de colocação das amostras no reómetro foram semelhantes para todas as suspensões de modo a evitar fatores de variabilidade não controlados.

### 3.4. Preparação e caracterização dos *scaffolds*

Os *scaffolds* de vidro bioativo foram produzidos usando um equipamento de deposição robótica da 3D Inks, LLC. Utilizando o *software* Robocad, foram desenhadas três estruturas diferentes, com três tamanhos de poro diferentes (200  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$  e 500  $\mu\text{m}$ ).

Foram fabricados *scaffolds* com a geometria ilustrada na Figura 11.

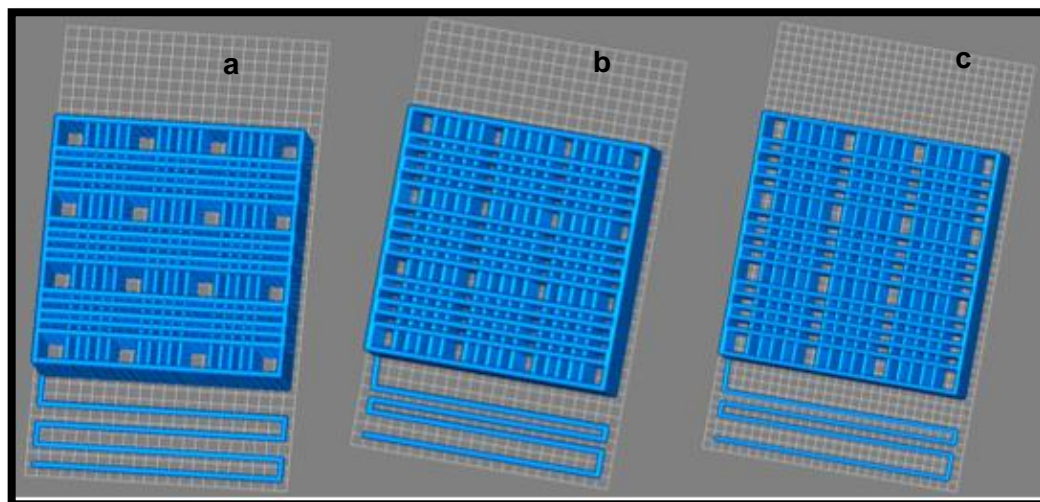
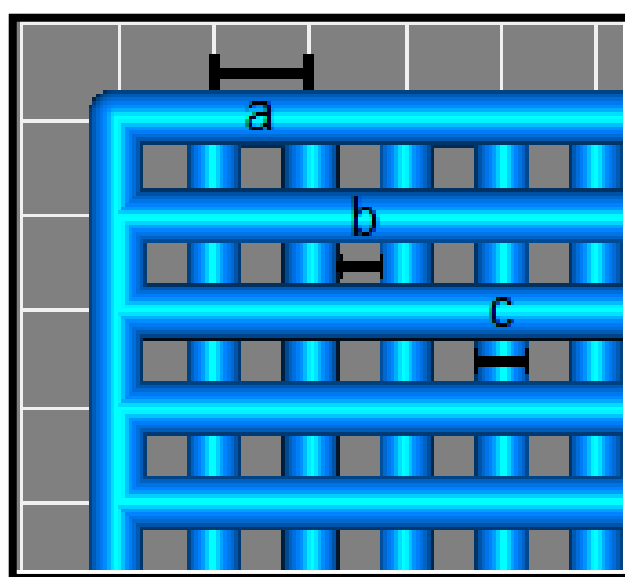


Figura 11 - Modelo CAD dos *scaffolds* fabricados, com diferentes tamanhos de poro: (a) 200  $\mu\text{m}$ , (b) 300  $\mu\text{m}$  e (c) 500  $\mu\text{m}$ .

A Tabela 11 apresenta os parâmetros de *design* e de processamento utilizados na produção dos *scaffolds*. Na Figura 12 estão ilustrados cada um dos parâmetros.

Tabela 11 - Parâmetros de *design* e de processamento dos *scaffolds*.

Parâmetros de design		$\mu\text{m}$		
Tamanho de poro		200	300	500
Largura do filamento		410	410	410
Distância entre filamentos		610	710	910
Parâmetros de processamento		mm/s		
Velocidade de deposição		10		

Figura 12 - Parâmetros dos *scaffolds*: (a) Distância entre filamentos; (b) Tamanho de poro; (c) Largura do filamento.

As pastas preparadas anteriormente foram colocadas em seringas com capacidade de 5 ml (Figura 13) e fixadas no equipamento de *robocasting*. Procedeu-se então à fabricação dos *scaffolds* seguindo os parâmetros acima referidos. As peças retiradas do banho de óleo passaram por uma fase de secagem à temperatura ambiente durante aproximadamente 48 horas.



Figura 13 - Seringa de 5ml contendo a pasta a ser extrudida no *robocasting*.

Posteriormente, os *scaffolds* obtidos foram sujeitos a uma etapa de queima dos componentes orgânicos com taxa de aquecimento de  $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até  $200^{\circ}\text{C}$ ,  $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até  $600^{\circ}\text{C}$  com um patamar de 1 hora e, subsequentemente, sinterizados a  $800^{\circ}\text{C}$  com um patamar de 1 hora e taxa de aquecimento de  $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Os *scaffolds* produzidos neste trabalho foram caracterizados quanto à sua microestrutura, tamanho de poro, porosidade e resistência mecânica à compressão.

A microestrutura foi observada por microscopia eletrônica de varrimento (SEM) usando o mesmo microscópio referido na secção 3.1.2. Para observação das amostras, foram realizados cortes transversais nos diferentes *scaffolds*, posteriormente fixados com cola de dupla face de carbono em porta-amostras de alumínio. As amostras foram revestidas com um filme de carbono obtido no evaporador de carbono (EMITECH K950).

O tamanho de poro dos *scaffolds* após a sinterização foi medido através das micrografias obtidas anteriormente, utilizando o *software* ImageJ. A retração foi calculada através da Equação 1:

$$\text{Retração}(\%) = \frac{W_i - W_f}{W_f} * 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Em que,  $W_i$  corresponde ao tamanho de poro inicial, predefinido nos parâmetros de fabrico dos *scaffolds*, e  $W_f$  ao tamanho de poro após a etapa de sinterização.

A densidade aparente, foi determinada a partir da massa e do volume aparente das amostras, de acordo com a Equação 2. Com base nos valores de densidade aparente dos *scaffolds* e da densidade teórica do vidro bioativo TCP-20 ( $2.92 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) [79], calcularam-se as frações de porosidade dos *scaffolds* através da Equação 3.

$$\rho_{aparente} = \frac{m_{scaffold}}{V_{scaffold}} \quad (\text{Equação 2})$$

$$P(\%) = 1 - \left( \frac{\rho_{aparente}}{\rho_{teórica}} \right) * 100 \quad (\text{Equação 3})$$

A massa dos *scaffolds* após a sinterização foi obtida por pesagem numa balança analítica com precisão  $10^{-4}$ g. Foram realizadas três medidas de massa, e utilizada a média aritmética para o cálculo da densidade aparente.

Foram realizadas medidas de comprimento, largura e altura utilizando um paquímetro digital. Com a média das medidas foram obtidos os valores para o cálculo do volume aparente que seria utilizado no cálculo da densidade aparente.

Os *scaffolds* foram também submetidos a ensaios de compressão para avaliação do módulo de Young e da resistência mecânica à compressão. Para isso, utilizou-se um equipamento universal de ensaios mecânicos SHIMADZU AG-IS (Figura 14), com velocidade de aplicação de carga de  $1 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  e uma célula de carga 10 kN.



**Figura 14 - Equipamento de ensaios mecânicos.**

Os ensaios foram realizados em 6 amostras com as dimensões descritas na Tabela 12, preparadas nas mesmas condições. Com a ajuda do programa de aquisição de dados “Trapezium2”, efetuou-se o registo simultâneo da força e do deslocamento do prato. Com esses dados, construiu-se o gráfico da tensão de rutura para os *scaffolds* com as três porosidades diferentes.

**Tabela 12 - Dimensões dos *scaffolds* utilizados nos ensaios mecânicos de compressão.**

Composição	Tamanho de poro ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Altura (mm)
<b>Targon + HPMC + TAC</b>	200	$2.3 \pm 0.04$	$2.3 \pm 0.01$	$3.2 \pm 0.007$
	300	$2.7 \pm 0.03$	$2.7 \pm 0.05$	$3.4 \pm 0.03$
	500	$3.2 \pm 0.33$	$2.9 \pm 0.60$	$3.3 \pm 0.01$
<b>CMC-250</b>	200	$2.2 \pm 0.03$	$2.2 \pm 0.004$	$3.1 \pm 0.03$
	300	$2.5 \pm 0.04$	$2.5 \pm 0.04$	$2.6 \pm 0.4$
	500	$3.2 \pm 0.02$	$3.2 \pm 0.04$	$2.4 \pm 0.06$

A tensão mede a força por unidade de área e calcula-se através do quociente entre a força aplicada e a área da secção transversal à direção de aplicação da força, usando a seguinte expressão:

$$\sigma \text{ (Pa)} = \frac{F}{A} \quad \text{(Equação 4)}$$

onde  $\sigma$  é a tensão de compressão resultante,  $F$  é a força de compressão uniaxial e  $A$  é a área inicial da superfície que suporta a força aplicada.

A deformação do material ( $\varepsilon$ ) é expressada pelo quociente entre a variação da altura ( $\Delta h$ ) e a altura inicial da amostra ( $h_0$ ):

$$\varepsilon = \frac{\Delta h}{h_0} \quad \text{(Equação 5)}$$

O módulo de Young pode ser obtido através da razão entre a tensão exercida e a deformação sofrida pelo material (Equação 6):

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (\text{Equação 6})$$

Na Figura 15 estão esquematizadas de uma forma resumida as etapas de todo o processo realizado ao longo deste trabalho.

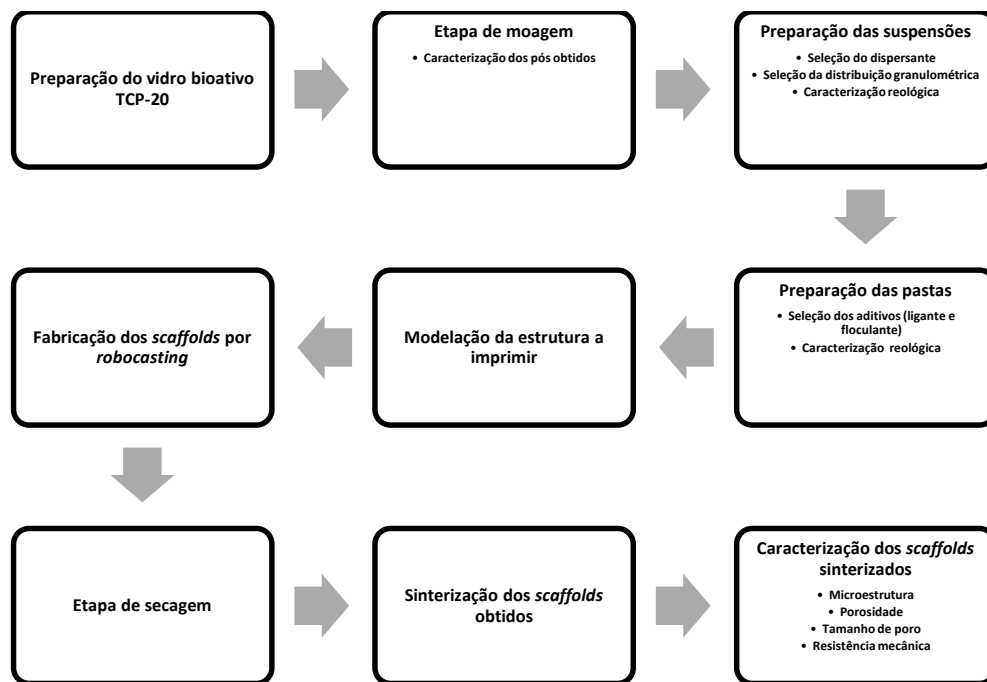


Figura 15 - Representação esquemática do procedimento realizado ao longo do trabalho.





# Capítulo 4

---

## Resultados e Discussão



## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Caracterização dos pós de vidro

#### 4.1.1. Caracterização cristalográfica

O espectro da análise de difração de raio-X da frita, ilustrado na Figura 16, mostra a ausência de fases cristalinas, confirmando a estrutura amorfa do vidro arrefecido em água.

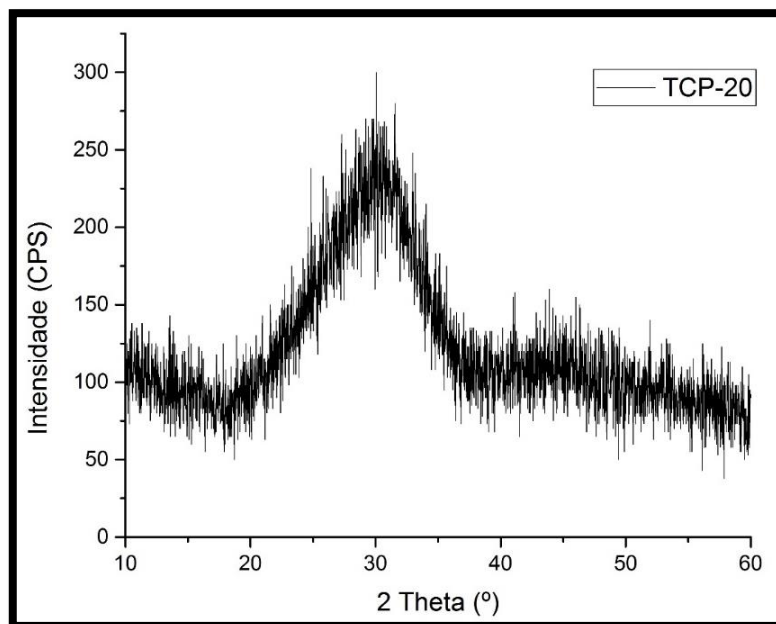


Figura 16 - Espectro de DRX da frita do vidro bioativo.

#### 4.1.2. Análise granulométrica

Uma etapa importante para a composição das pastas a utilizar no *robocasting* é a preparação de suspensões estáveis com as seguintes características:

- alto teor de sólidos para minimizar a contração induzida por secagem após a finalização da peça, de modo a que a rede de partículas seja capaz de resistir a tensões de compressão resultantes da tensão capilar;

- comportamento viscoelástico controlado, de forma a fluir através da ponta de deposição e a manter-se, imediatamente, na forma depositada, mesmo quando atravessa lacunas na camada subjacente [80].

Para garantir estas propriedades na pasta, o tamanho e a distribuição de tamanhos de partícula têm um papel crucial. Por este motivo, o tamanho e distribuição de tamanhos de partículas dos pós de vidro, na ausência e presença de dispersante, bem como o efeito da desaglomeração, foram controlados a fim de melhorar a capacidade de compactação e, conseqüentemente, melhorar a microestrutura dos *scaffolds* obtidos.

A distribuição de tamanhos das partículas dos pós de vidro foi medida sempre na presença de dispersante. As dimensões das partículas dos pós de vidro, por serem finas, na ausência de dispersante apresentam uma forte tendência à aglomeração, permanecendo unidas pelas forças de atração de Van der Waals.

Quando estas partículas são colocadas num meio líquido, a sua elevada área superficial específica acentua a atuação das forças superficiais, afetando diretamente o seu estado de dispersão, tornando a sua distribuição aparentemente mais alargada. De modo a evitar a aglomeração das partículas, é necessária a presença de forças de repulsão que superem as forças de atração presentes no sistema. Estas forças de repulsão podem ser criadas através da adição de um dispersante que por meio do desenvolvimento de cargas elétricas nas partículas, impede a sua aproximação, tornando a suspensão constituída por partículas individualizadas, livre de aglomerados [81]. O uso de um dispersante eficaz é essencial para baixar a viscosidade das suspensões, maximizar a concentração de sólidos, e garantir elevada homogeneidade. Para o efeito, as suspensões são também sujeitas a uma fase de desaglomeração em moinho de rolos. Este processo fornece energia suficiente para separar as partículas unidas por forças superficiais, tornando a suspensão mais homogênea e livre de aglomerados.

A Figura 17 apresenta a evolução das curvas de distribuição granulométrica do vidro bioativo ao longo de seis dias de moagem em etanol num moinho de rolos. Pode verificar-se que o tamanho médio de partícula passou de cerca de 10  $\mu\text{m}$  para ~7  $\mu\text{m}$ , tendo a alteração mais significativa da fração grosseira ocorrido até aos 3 dias. A redução de tamanhos das partículas continuou até aos 4 dias, não sendo evidentes os benefícios de prolongar o processo de moagem nestas condições.

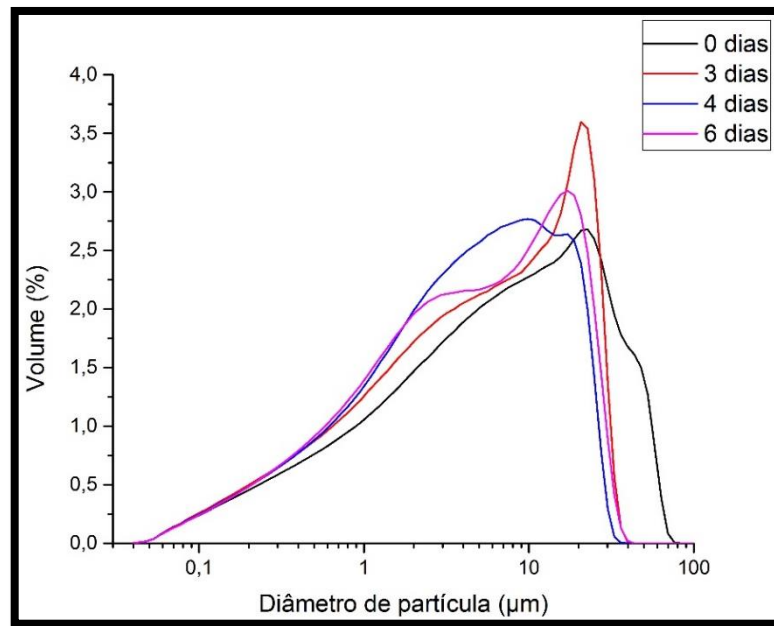
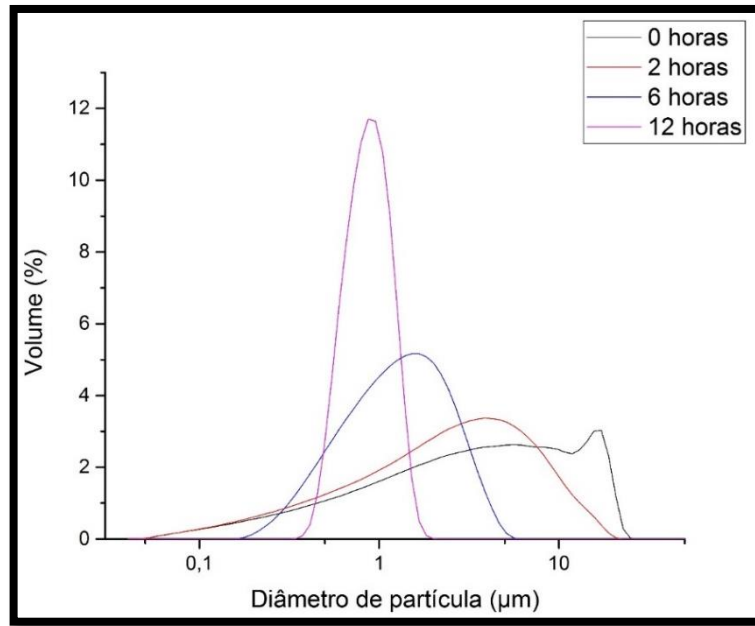


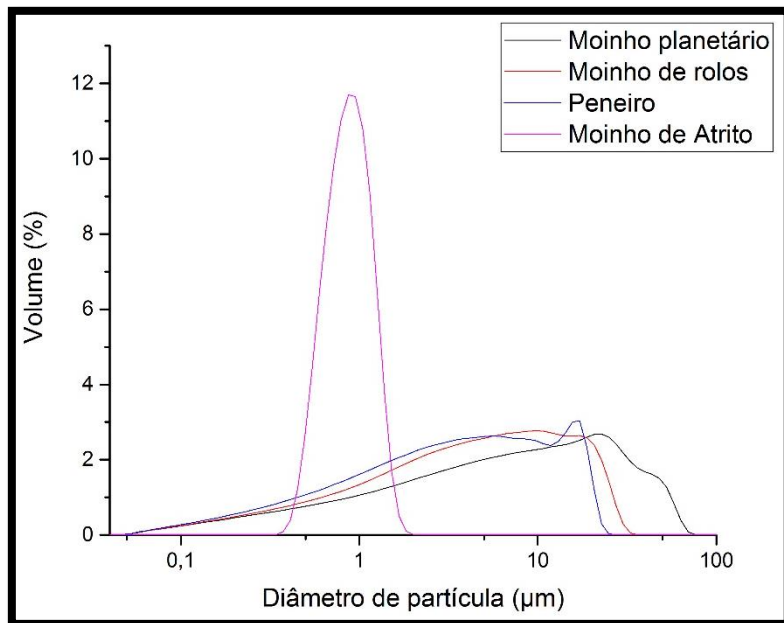
Figura 17 - Evolução da distribuição granulométrica das partículas de vidro bioativo ao longo do processo de moagem no moinho de rolos.

De forma a eliminar as partículas mais grosseiras, ou aglomerados, os pós passaram por um peneiro com uma malha de 40 µm. Este é um processo importante para limitar o tamanho máximo de partículas presentes na pasta a ser extrudida, que está dependente da ponta utilizada no *robocasting*, uma vez que as partículas devem ser, pelo menos, 10 vezes menores do que o diâmetro da ponta utilizada. A Figura 18 mostra que o pó de vidro bioativo passado através do peneiro de 40 µm ainda apresenta um tamanho médio exagerado. Pode verificar-se também que a moagem em moinho de atrito se revelou efetiva na redução gradual do tamanho das partículas. As curvas de distribuição granulométrica foram ficando cada vez mais estreitas, atingindo-se um tamanho médio de partícula de ~4 µm ao fim de 2 horas de moagem e ~1 µm ao fim de 12 horas de moagem.



**Figura 18 - Evolução da distribuição granulométrica das partículas de vidro bioativo no processo de moagem no moinho de atrito.**

A Figura 19 resume a evolução da distribuição granulométrica do biovidro ao longo dos vários processos de moagem utilizados, pela seguinte ordem: moinho planetário (2 horas, 200 rpm), moinho de rolos (6 dias), após passagem através do peneiro de 40  $\mu\text{m}$ , e moído em moinho de atrito (12 horas).



**Figura 19 - Evolução da distribuição granulométrica das partículas de vidro bioativo ao longo das várias etapas do processo de moagem.**

Dos vários processos utilizados, o moinho de atrito foi o mais eficaz na redução do tamanho das partículas.

#### 4.1.3. Análise morfológica

As partículas do biovidro com tamanho médio de 4  $\mu\text{m}$ , obtidas através do processo de moagem no moinho de atrito durante 2 h, foram dispersas em água na ausência e na presença de dispersante de modo a obter suspensões diluídas. Gotículas dessas suspensões diluídas foram depositadas em lamelas de vidro, suportadas por porta-amostras metálicos, e secas para obter amostras para análise morfológica por SEM. A Figura 20 apresenta algumas micrografias com diferentes amplitudes. Pode observar-se que o pó é constituído predominantemente por partículas relativamente isométricas mas angulosas, características típicas de um vidro moído. Neste caso não há diferenças morfológicas notórias entre as partículas dispersas na ausência e na presença de dispersante.

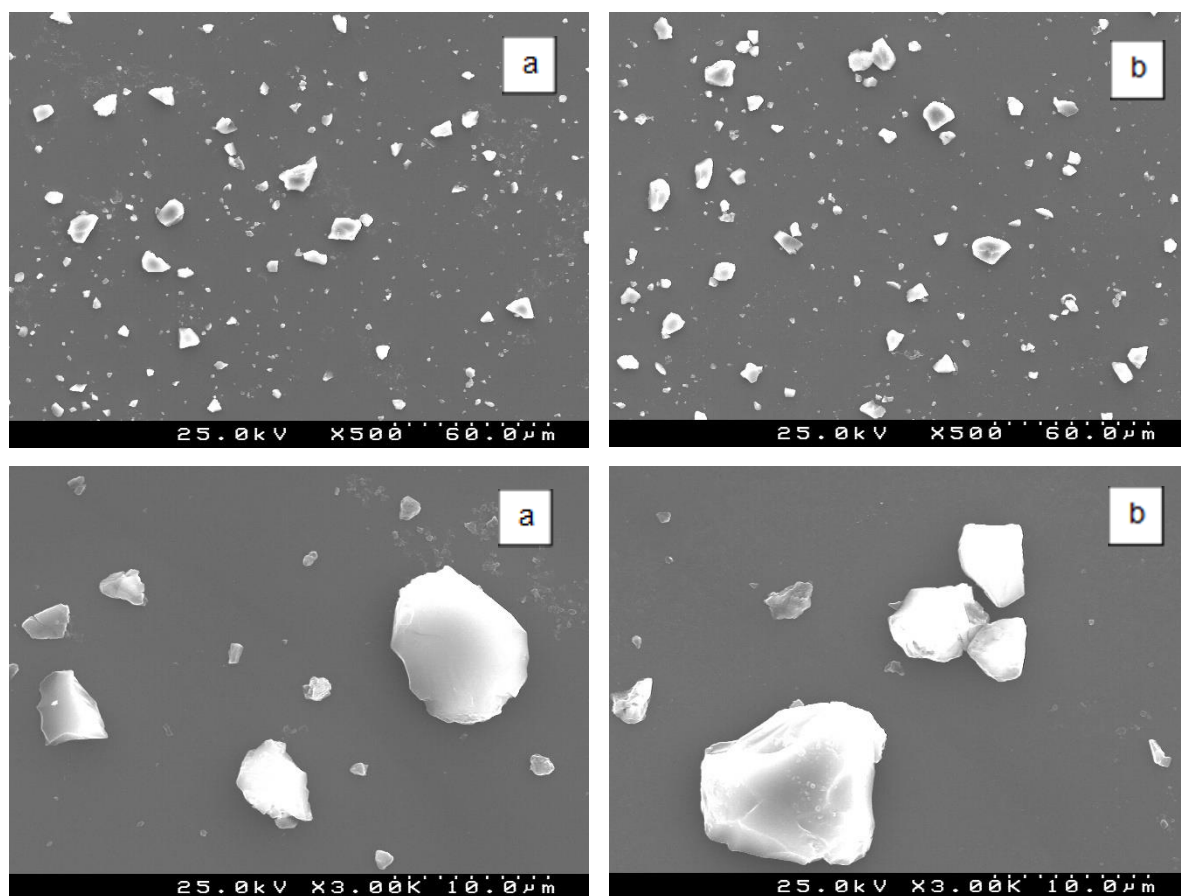


Figura 20 - Micrografias obtidas por SEM das partículas de vidro com tamanho médio de 4  $\mu\text{m}$  na ausência a) e na presença b) de dispersante.

As partículas com tamanho médio de 1  $\mu\text{m}$  apresentam morfologia idêntica à das partículas anteriores, distinguindo-se essencialmente pelas suas menores dimensões, como seria de esperar. Na ausência de dispersante, nota-se a tendência das partículas para se apresentarem sob a forma de aglomerados. Este facto não é surpreendente considerando que entre as partículas de menor dimensão as forças atrativas de Van der Waals tendem a prevalecer sobre a força gravítica, contrariamente ao que se verifica entre partículas maiores.

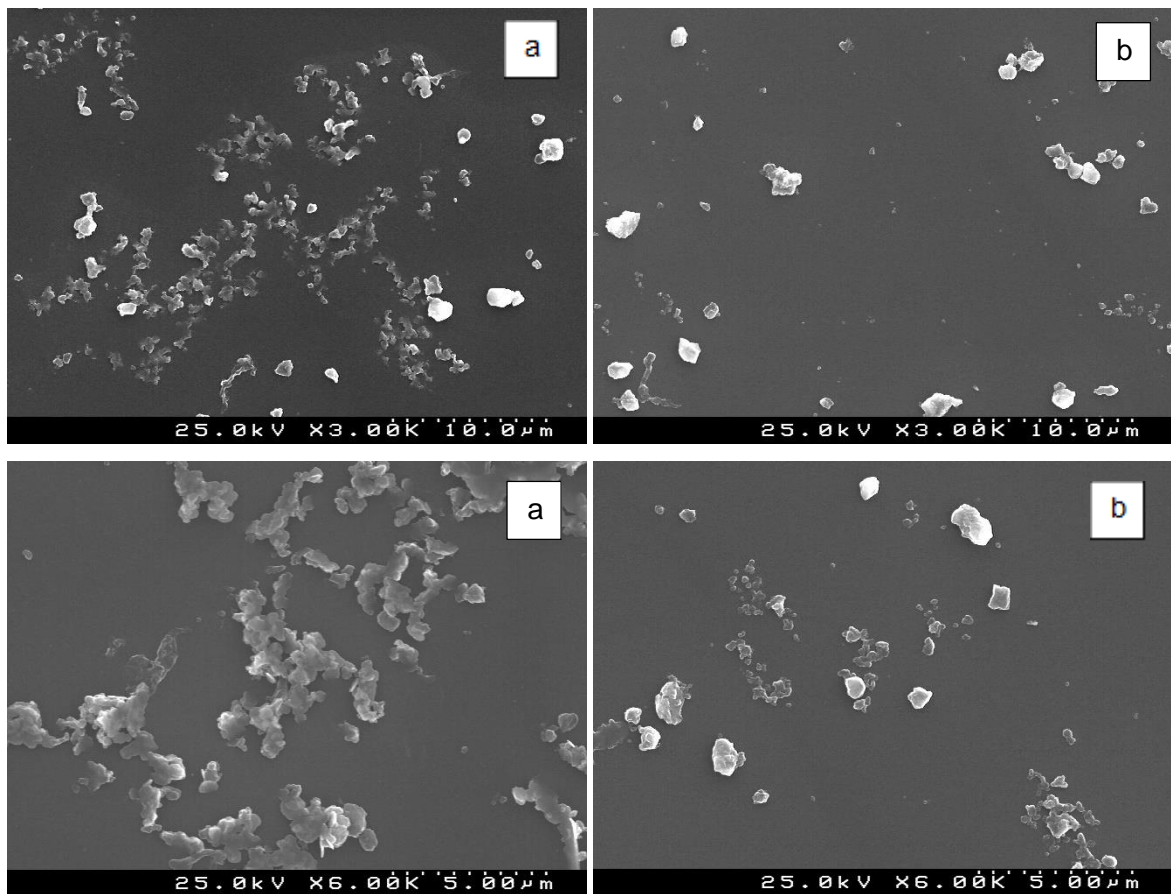


Figura 21 - Micrografias obtidas por SEM das partículas de vidro com tamanho médio de 1  $\mu\text{m}$  na ausência a) e na presença b) de dispersante.

Ambos os pós apresentam partículas micrométricas e de forma um pouco irregular. A Figura 22 compara as diferenças de tamanhos dos pós de biovidro utilizados.



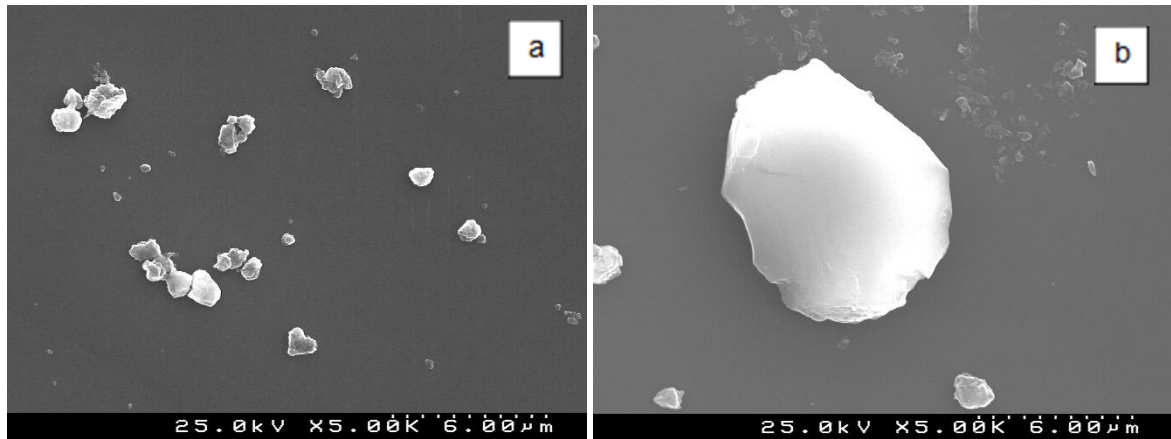


Figura 22 - Micrografias obtidas por SEM das partículas de vidro com tamanhos médios de a) 1  $\mu\text{m}$  e b) 4  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.4. Análise térmica diferencial e Termogravimétrica

A Figura 23 apresenta a curva de ATD/TG para o vidro obtida a uma taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

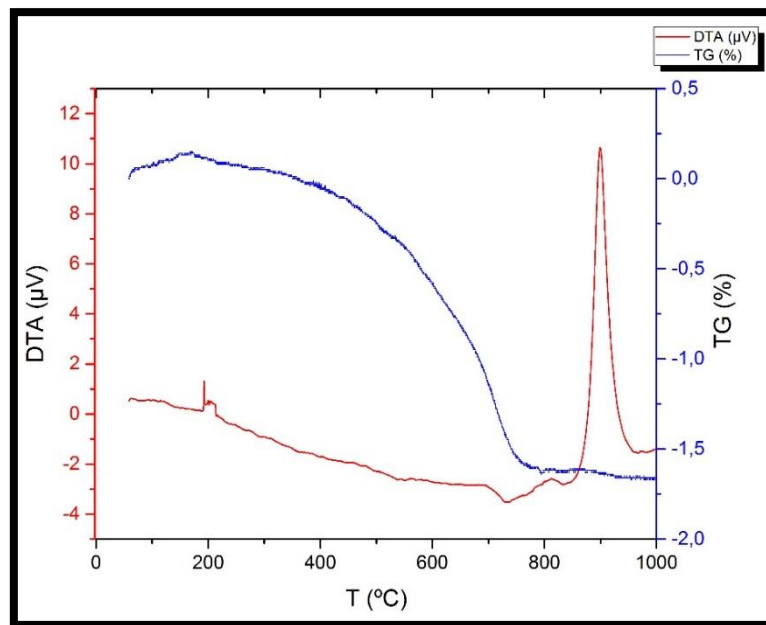


Figura 23 - Curva de análise termogravimétrica e térmica diferencial do biovidro.

O resultado da análise termogravimétrica presente na Figura 23 mostra um total de aproximadamente 1,8% de redução da massa. Na mesma figura, a ATD mostra um efeito

endotérmico a  $T_g=720^{\circ}\text{C}$ , causado pela transição vítrea, seguido de um pico exotérmico de cristalização que começa em  $T_c=850^{\circ}\text{C}$ .

## 4.2. Caracterização das suspensões

Tal como foi mencionado no procedimento experimental, os três dispersantes mais promissores com base nos resultados dos testes de sedimentação (Targon 1128, Dispex A40 e Darvan 821A) foram selecionados e testou-se a sua eficácia na dispersão de elevadas concentrações do vidro. Para o efeito, prepararam-se suspensões aquosas contendo 45 vol.% de sólidos, com o vidro bioativo de tamanho médio  $1\text{ }\mu\text{m}$ , na presença de 0.5 wt.% de cada um dos dispersantes, e procedeu-se à sua caracterização reológica através das curvas de fluxo, as quais estão apresentadas na Figura 24. Pode verificar-se que a viscosidade diminui com o aumento da velocidade de corte para todos os dispersantes testados. Mas o Targon 1128 é aquele que torna a suspensão mais fluída. Na presença de Darvan 821A, a curva é bastante irregular. Estas características sugerem que o Targon 1128 é o dispersante mais eficaz na estabilização das partículas de TCP-20, justificando a sua seleção para prosseguir com os estudos seguintes.

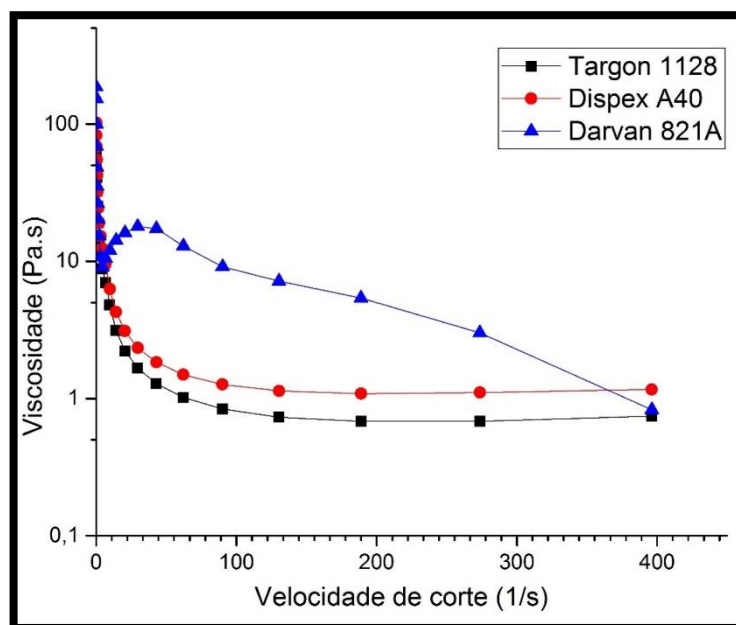
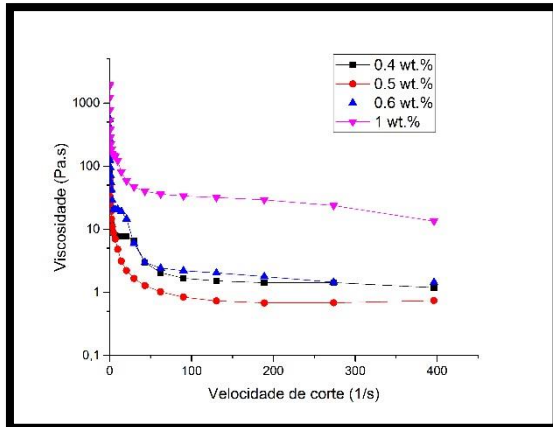
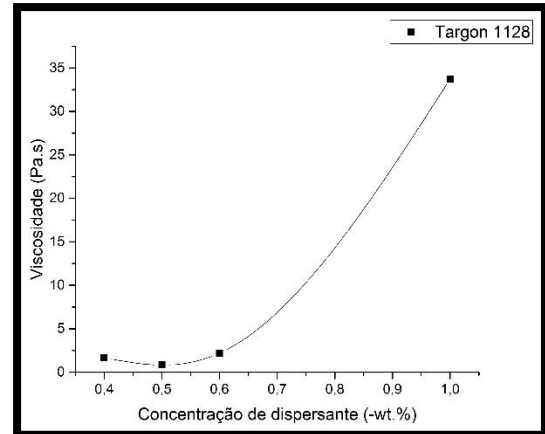


Figura 24 - Curvas de fluxo das suspensões de TCP-20 em meio aquoso contendo 45 vol.% de sólidos, preparadas com 0.5 wt.% de Targon 1128, Dispex A40 e Darvan 821A.

Com vista a determinar a quantidade ótima de Targon 1128 para a preparação de suspensões concentradas de vidro bioativo, testaram-se os efeitos da adição de diferentes concentrações deste dispersante nas curvas de fluxo. Os resultados estão apresentados nas Figuras 25 e 26.



**Figura 25 - Curvas de fluxo das suspensões à base de TCP-20, preparadas com diferentes concentrações de Targon 1128.**



**Figura 26 - Curva de desfloculação das suspensões preparadas à base de TCP-20, com diferentes concentrações de Targon 1128.**

A Figura 25 mostra que a viscosidade diminui com o aumento da velocidade de corte para todas as concentrações de dispersante, e que o sistema mais fluido se obtém na presença 0,5 wt.% de Targon 1128. O efeito do teor de dispersante na viscosidade das suspensões, para a velocidade de corte de  $90 \text{ s}^{-1}$ , está resumido na Figura 26, confirmando que 0,5 wt.% de Targon 1128 é a quantidade de dispersante mais adequada para a preparação de suspensões à base de TCP-20. Esta informação é essencial para a obtenção de uma suspensão inicial homogênea e estável para a preparação de pastas extrudíveis, destinadas ao fabrico de estruturas porosas por deposição robótica.

Mas estes resultados não nos informam acerca dos eventuais mecanismos de estabilização das partículas do biovidro. Assim, a preparação das suspensões concentradas foi precedida de medidas de potencial zeta do TCP-20 em suspensões muito diluídas, na ausência e na presença de 0,5 wt.% de dispersante Targon 1128. A eletroforese fornece informação complementar nomeadamente acerca da componente electrostática para a estabilização. Os resultados, apresentados na Figura 27, mostram que o potencial zeta é sempre negativo em toda a gama de valores de pH testados,

sugerindo a predominância à superfície das partículas de grupos silanol, típicos de superfícies da sílica hidratadas [82].

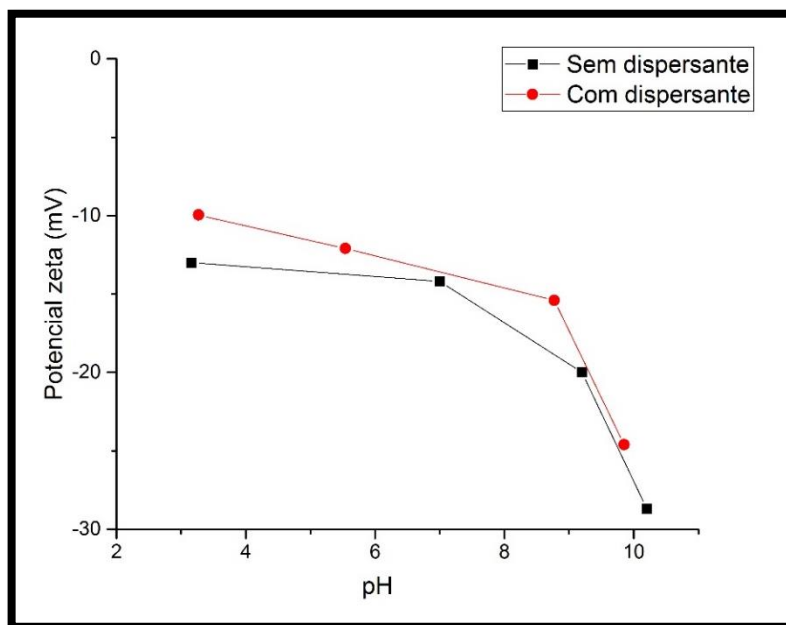
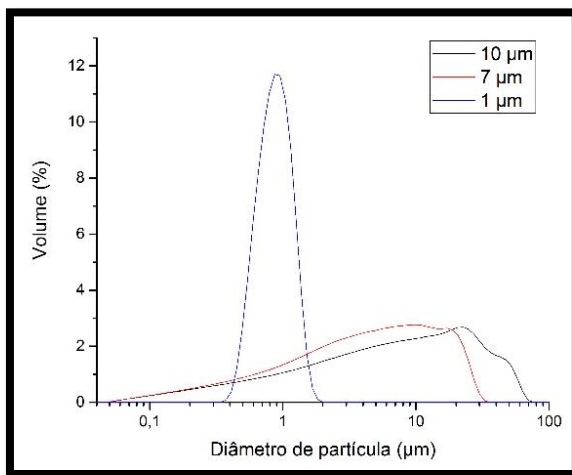


Figura 27 - Curvas de eletroforese do TCP-20 na ausência e na presença de 0.5 wt.% de Targon 1128.

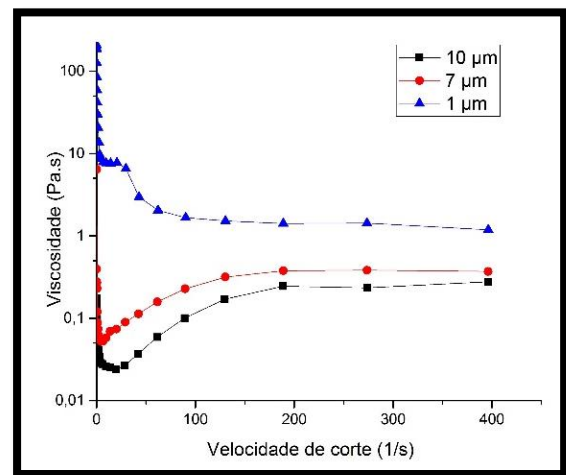
Constata-se ainda que os valores absolutos de potencial zeta são sempre superiores na ausência de dispersante, contrariamente ao que seria de esperar no caso da adsorção específica de um polieletrólito de natureza aniônica. Note-se, contudo, que para além do incremento de carga superficial negativa causado pela adsorção de espécies aniônicas, as cadeias do polieletrólito podem também deslocar o plano de deslizamento onde se mede o potencial zeta para distâncias mais afastadas da superfície. Esta hipótese ajudaria a explicar estes resultados de eletroforese aparentemente estranhos.

É provável que as cadeias do polieletrólito distendidas para a solução decresçam a mobilidade eletroforética através de uma espécie de efeito de cabeleira. O balanço global deverá depender da importância relativa do incremento de carga elétrica e deste efeito de cabeleira, tornando mais complexa a determinação e interpretação do comportamento eletroforético, mas deixando adivinhar a contribuição estérea para estabilização [83]. Esta hipótese é consistente com os resultados da caracterização reológica das suspensões concentradas obtidos anteriormente, os quais também sugeriam a existência de uma componente estérea para a estabilização do sistema na presença do dispersante Targon 1128.

Tal como mencionado anteriormente, os métodos de fabrico aditivo, como o *robocasting*, requerem o uso de pastas concentradas de forma a minimizar as retrações durante os processos de secagem e sinterização. Por outro lado, sendo o processo de fabrico baseado na extrusão através de pontas micrométricas, é fundamental que as pastas apresentem um comportamento reológico adequado e não entupam/bloqueiem a ponta da seringa. As características reológicas das suspensões iniciais foram avaliadas através das curvas de fluxo com o objetivo de selecionar as condições experimentais (concentrações de sólidos e de dispersante, tamanho e distribuição granulométrica das partículas) que conduzissem a um comportamento adequado. As curvas de distribuição granulométrica e tamanhos médios de partícula resultantes dos diferentes processos de moagem (moinho planetário: 10  $\mu\text{m}$ , moinho de rolos: 7  $\mu\text{m}$  e moinho de atrito: 1  $\mu\text{m}$ ) estão apresentadas na Figura 28. As curvas de fluxo das respetivas suspensões aquosas contendo 45 vol.% de TCP-20 na presença de 0.5 wt.% de dispersante estão apresentadas na Figura 29. Pode verificar-se que as suspensões de partículas com tamanhos médios de 10 e 7  $\mu\text{m}$  apresentam comportamentos claramente reo-espessantes, especialmente na gama de taxas de corte entre cerca de 10–200  $\text{s}^{-1}$ . Este incremento da viscosidade com o aumento da velocidade de corte é inadequado, e pode atribuir-se quer a tamanhos de partículas demasiado grandes ou distribuições granulométricas pouco favoráveis ao fluxo.



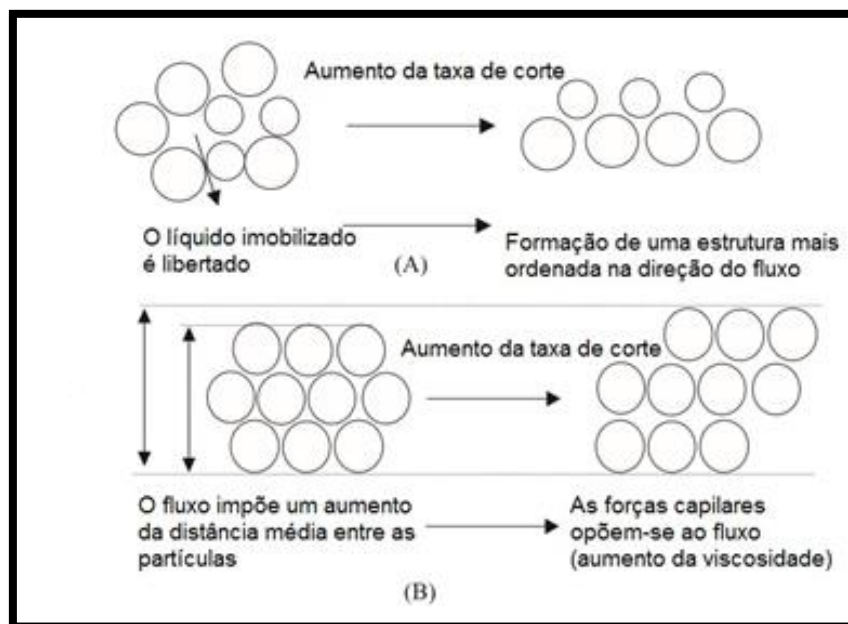
**Figura 28 - Distribuição granulométrica das partículas de vidro bioativo com três tamanhos médios diferentes.**



**Figura 29 - Curvas de fluxo das suspensões concentradas de TCP-20 com diferentes tamanhos de partícula.**

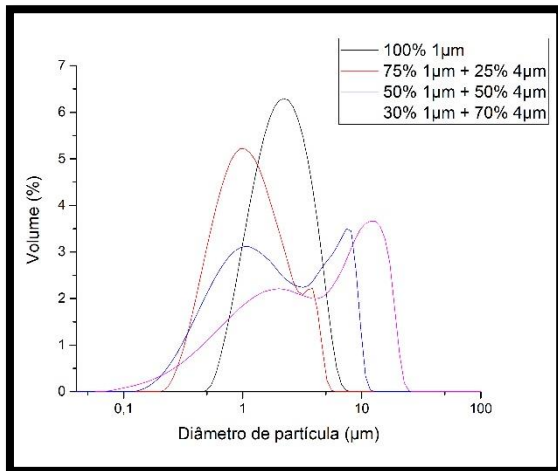
Apenas o pó de biovidro com um tamanho médio de partícula de 1  $\mu\text{m}$  permitiu obter uma suspensão com um comportamento reo-fluidificante (diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de deformação). Este tipo de comportamento corresponde a uma rutura gradual da estrutura formada nas suspensões altamente concentradas. Com o aumento da taxa de corte, algum do líquido intersticial é libertado permitindo que as partículas formem um arranjo mais ordenado na direção do fluxo, resultando assim num decréscimo da viscosidade, tal como se verifica para esta suspensão. Quando a distribuição granulométrica não é favorável ao fluxo, as partículas tendem a aglomerar sob a ação de velocidades de corte crescentes. Estes tipos de interações entre partículas dispersas quando sujeitas a ações de corte estão esquematizados na Figura 30.

Assim, com vista a melhorar o comportamento ao fluxo, procurou-se aumentar a capacidade de empacotamento das partículas em suspensão através da combinação de pós com diversos tamanhos médios de partícula em diferentes proporções. As mais finas tendem a ocupar os espaços intersticiais entre as de maiores dimensões, permitindo libertar o líquido imobilizado nos espaços intersticiais e baixar a viscosidade do sistema. Isto pode criar eventuais oportunidades para aumentar a fração volúmica de sólidos, com benefícios óbvios para o processamento [76]

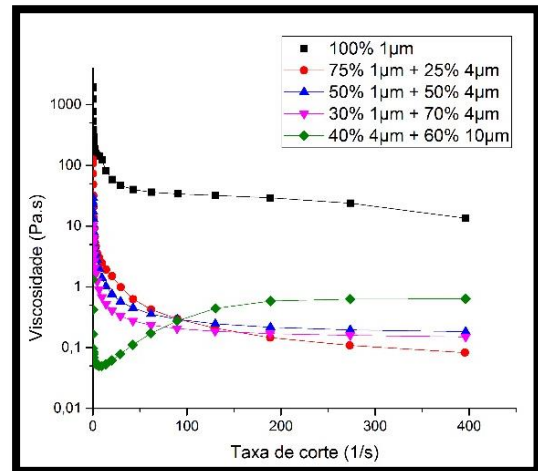


**Figura 30 - Ilustração esquemática dos comportamentos reo-fluidificante (A) e reo-espessante (B). Adaptado de [84].**

Para o efeito, o biovidro foi sujeito a tempos de moagem diferentes e misturados nas proporções indicadas nas Figuras 31-32. Verifica-se que as distribuições de partículas mais alargadas (Figura 31) foram aquelas que apresentaram melhor comportamento ao fluxo (Figura 32), baixando a viscosidade e anulando o carácter reo-espessante das suspensões preparadas com uma única granulometria. Estes resultados estão em consonância com o que era esperado [84].



**Figura 31 - Curvas de distribuição granulométrica de misturas de pós com diferentes tamanhos de partículas, em diferentes proporções.**

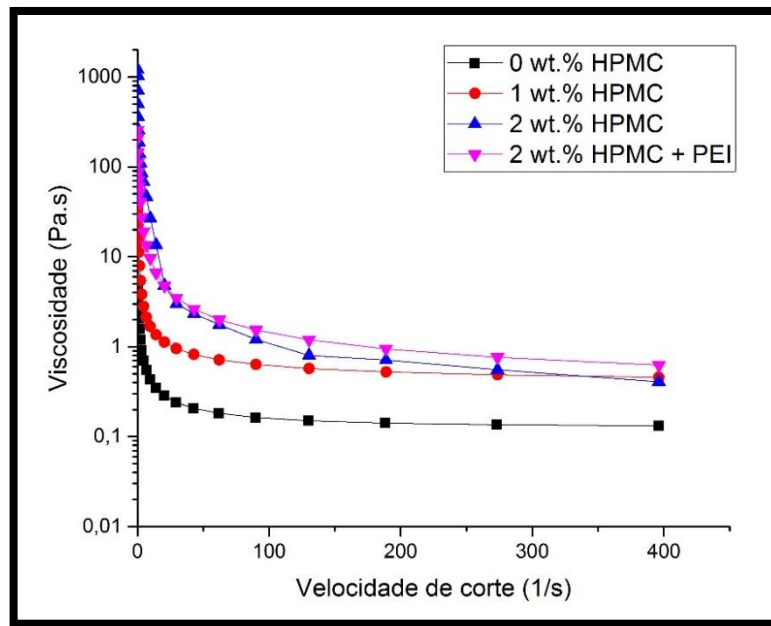


**Figura 32 - Curvas de fluxo de suspensões preparadas de misturas de pós com diferentes tamanhos de partículas, em diferentes proporções.**

### 4.3. Caracterização das pastas

Após a seleção do dispersante e da quantidade mais adequada, e também da distribuição de tamanho das partículas de vidro, procedeu-se ao estudo dos efeitos da adição dos diferentes aditivos de processamento no comportamento do fluxo das suspensões. A uma suspensão aquosa de TCP-20 com 45 vol.% de sólidos preparada com uma mistura de partículas 50-50 (1 µm e 4 µm) dispersas com 0.5 wt.% de Targon 1128, foram tentativamente adicionados 1 e 2 wt.% de HPMC como agente espessante/ligante. A concentração de sólidos foi reduzida para 43 vol.% com a adição da solução de HPMC. As curvas de fluxo das suspensões na ausência e na presença de HPMC, bem como da suspensão com 2 wt.% depois de baixar a concentração de sólidos para 40 vol.% e de adicionar 2.28 wt.% de PEI com vista a provocar a sua floculação estão representadas na Figura 33.





**Figura 33 - Efeitos da adição dos aditivos de processamento nas curvas de fluxo de uma suspensão com 45 vol.% de sólidos e 0.5 wt.% de Targon 1128. A suspensão inicial foi diluída para 43 vol.% de sólidos na presença de 2 wt.% de HPMC, e para 40 vol.% de sólidos com a posterior adição a esta de 2.28 wt.% de PEI.**

A Figura 33 mostra um aumento gradual da viscosidade das suspensões com quantidades incrementais de HPMC, em comparação com a suspensão na ausência deste aditivo. Pode-se confirmar que o HPMC apresenta um efeito espessante, aumentando a viscosidade das suspensões.

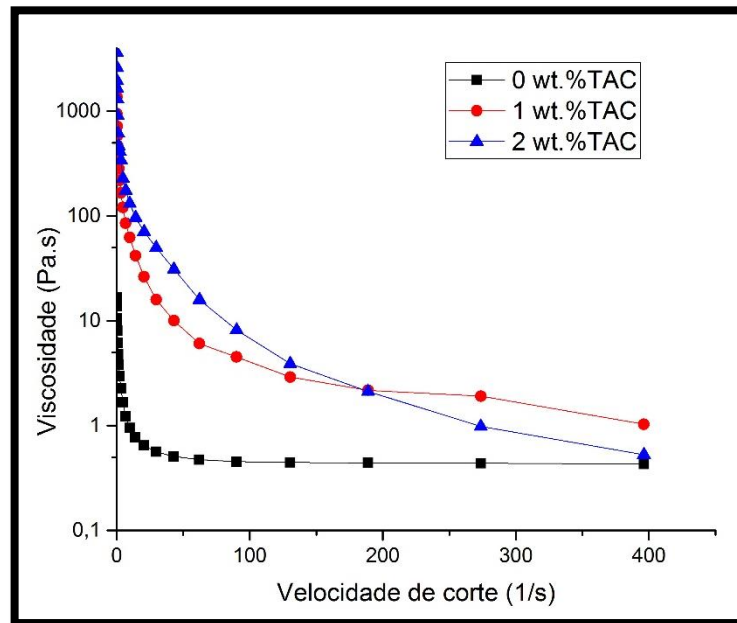
A suspensão preparada com 2 wt.% de HPMC apresenta um comportamento mais viscoso para velocidades de corte mais baixas. Com o aumento da taxa de deformação, a viscosidade tende a diminuir, e até coincide com a curva de fluxo da suspensão preparada com 1 wt.% de HPMC. Com base nesta análise, selecionou-se a concentração de 2 wt.% de HPMC para a preparação das suspensões.

A capacidade da PEI como agente floculante foi avaliada através da sua adição gradual à suspensão contendo 43 vol.% de sólidos, começando com 0.2 wt.% de PEI. O comportamento reológico da suspensão manteve-se inalterado. Procedeu-se então a incrementos graduais até 2.28 wt.% de PEI os quais também não causaram alterações reológicas significativas, apenas contribuindo para uma diluição gradual da suspensão inicial. Esta ineficácia da PEI foi atribuída ao seu fraco grau de dissociação no ambiente alcalino que é o pH natural das suspensões de biovidro (pH  $\approx$ 9). Este valor de pH



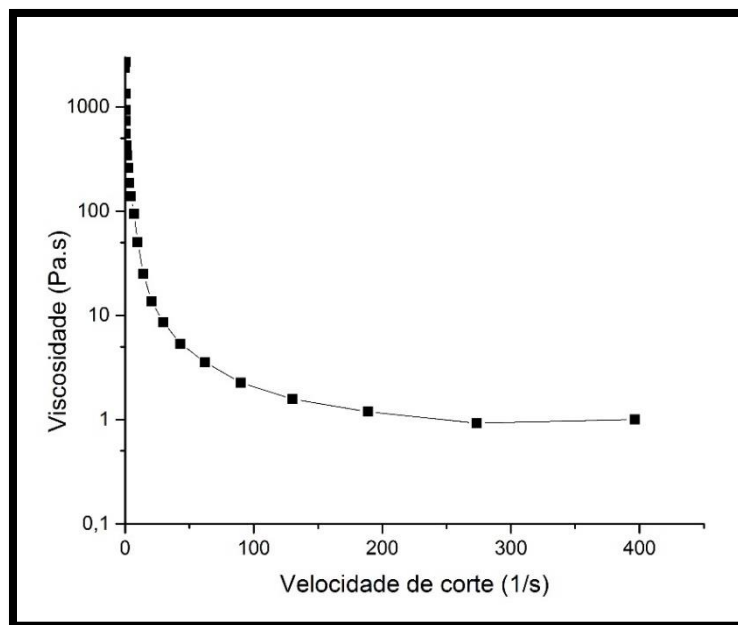
relativamente elevado pode atribuir-se à lixiviação dos elementos alcalino-terrosos para o meio de dispersão, facilitada pela granulometria fina dos pós.

O fraco desempenho da PEI como agente floculante levou à busca de aditivos de processamento alternativos, tal como o Aristoflex® TAC. A Figura 34 apresenta as curvas de fluxo de suspensões com 45 vol.% de sólidos e 0.5 wt.% de Targon 1128, na ausência e na presença de diferentes teores deste aditivo.



**Figura 34 - Curvas de fluxo de suspensões com 45 vol.% de sólidos, preparadas com 0.5 wt.% de Targon 1128, e com diferentes teores de TAC (1 wt.% e 2 wt.%).**

A Figura 34 mostra que a adição do Aristoflex® TAC aumenta consideravelmente a viscosidade das suspensões de vidro bioativo, especialmente na gama mais baixa de velocidades de corte, acentuando o seu carácter reo-fluidificante. Com base na análise destes resultados, preparou-se uma suspensão inicial com 47 vol.% de sólidos, 0.5 wt.% de Targon 1128, 2 wt.% de HPMC, à qual foram adicionados diferentes teores de Aristoflex® TAC (0.5 wt.%, 1 wt.% e 1.25 wt.%) até se obter uma pasta passível de ser extrudada no *robocasting*.



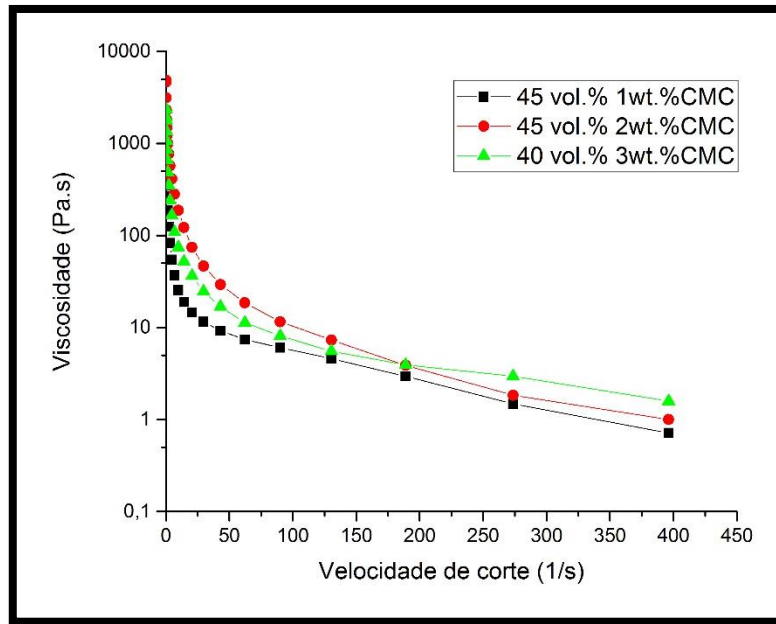
**Figura 35 - Curva de fluxo da suspensão com 47 vol.% de sólidos, 0.5 wt.% de Targon 1128, 2 wt.% de HPMC e 1 wt.% de TAC.**

Através da Figura 35, é possível observar que a pasta anteriormente preparada apresenta o tipo de comportamento reo-fluidificante que é pretendido para uma utilização bem-sucedida no *robocasting*.

Outra opção a explorar na preparação de suspensões, e posteriormente pastas, à base de vidro bioativo, para a fabricação aditiva de *scaffolds*, é a utilização de um aditivo único. Em dois trabalhos anteriores, o CMC-250 foi utilizado como um aditivo multifuncional (dispersante, ligante e floculante) [49,82].

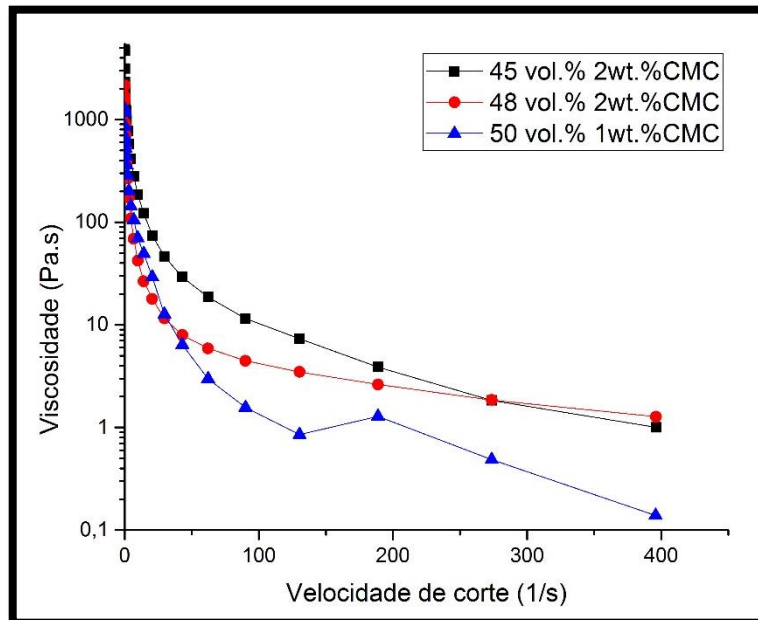
Prepararam-se suspensões com diferentes concentrações de TCP-20 e de CMC-250 (Tabela 9), e estudaram-se os seus efeitos nas curvas de fluxo das pastas preparadas. Partindo de uma concentração de sólidos inicial de 45 vol.%, tentaram-se diferentes adições de CMC-250 (1, 2 e 3 wt.%).

As curvas de fluxo das pastas na presença de CMC-250 apresentadas na Figura 36 mostram um aumento gradual da viscosidade com o aumento da concentração de CMC-250. Verificou-se que o acréscimo de viscosidade causado pela adição de 3 wt.% era demasiado e o sistema não fluía, impossibilitando a preparação de uma pasta homogênea, obrigando a uma diminuição da concentração de sólidos para os 40 vol.%. A curva de fluxo desta pasta aparece situada numa posição intermédia relativamente às outras duas, demonstrando a interdependência entre as principais variáveis do processo.



**Figura 36 - Curvas de fluxo das pastas preparadas na presença de diferentes concentrações de CMC-250.**

Depois de verificar o efeito do CMC-250 como único aditivo na preparação de pastas homogêneas à base de vidro bioativo TCP-20, procedeu-se ao estudo da influência da concentração de sólidos (45, 48 e 50 vol.%) do sistema para 2 wt.% de CMC-250. As curvas de fluxo das pastas resultantes são apresentadas na Figura 37.



**Figura 37 - Curvas de fluxo das pastas preparadas na presença de diferentes concentrações de sólidos.**

Estas curvas mostram um aspeto aparentemente intrigante: um decréscimo da viscosidade com o aumento da concentração de sólidos de 45 vol.% para 48 vol.%. Não foi possível preparar a pasta com 50 vol.% de sólidos e 2 wt.% de CMC-250 por causa do aumento exagerado da viscosidade intrínseca do meio de dispersão. Por isso, reduziu-se o teor de CMC-250 para 1 wt.% de modo a avaliar os efeitos combinados destas variáveis. Este sistema apresentou uma viscosidade inferior aos anteriores e uma curva de fluxo mais irregular. Todos estes sistemas apresentam comportamento reo-fluidificante, essencial para evitar o entupimento das pontas de extrusão micrométricas sob elevadas taxas de deformação.

Mas as pastas a utilizar no *robocasting* deverão ainda exibir propriedades visco-elásticas adequadas que permitam uma recuperação rápida da estrutura interna que foi destruída sob a ação das tensões de corte de modo a que os cilindros extrudidos mantenham a sua forma, e sejam capazes de suportar o seu peso e o peso das camadas subsequentes. Para avaliar essas características, as pastas foram submetidas a testes reológicos em modo oscilatório. Estes testes não destrutivos permitem medir em simultâneo as componentes elástica e viscosa do sistema. A componente elástica é expressa por  $G'$  e caracteriza a magnitude da tensão armazenada no material. A componente viscosa, expressa por  $G''$ , caracteriza a energia perdida como dissipação viscosa por cada ciclo de deformação.

Os dois parâmetros,  $G'$  e  $G''$ , são influenciados pela frequência de oscilação, a concentração de sólidos e de aditivos de processamento, a temperatura e a percentagem de deformação [85].

A Figura 38 apresenta a dependência do módulo elástico à temperatura ambiente de uma pasta à base de TCP-20 com 40 vol.% de sólidos e com a adição de 0.5 wt.% de Targon, 2 wt.% de HPMC e 2.28 wt.% de PEI. Observa-se uma espécie de patamar com valores de  $G'$  de cerca de 10–30 kPa até tensões de corte da ordem dos 5 Pa, limite da zona de viscoelasticidade linear, a partir do qual  $G'$  decresce de forma abrupta devido à destruição gradual da estrutura interna da tinta.

A Figura 39 mostra o mesmo tipo de curvas mas para pastas com a adição de CMC-250 correspondentes às curvas de fluxo apresentadas na Figura 35. Pode verificar-se que: (i) para as pastas com 45 vol.% de sólidos, o incremento de CMC-250 de 1 wt.% para 2 wt.% fez aumentar  $G'$  em mais de uma ordem de grandeza; (ii) O aumento de  $G'$  foi ainda

ligeiramente superior pelos efeitos combinados do decréscimo da concentração de sólidos para 40 vol.% e do incremento de CMC-250 para 3 wt.%.

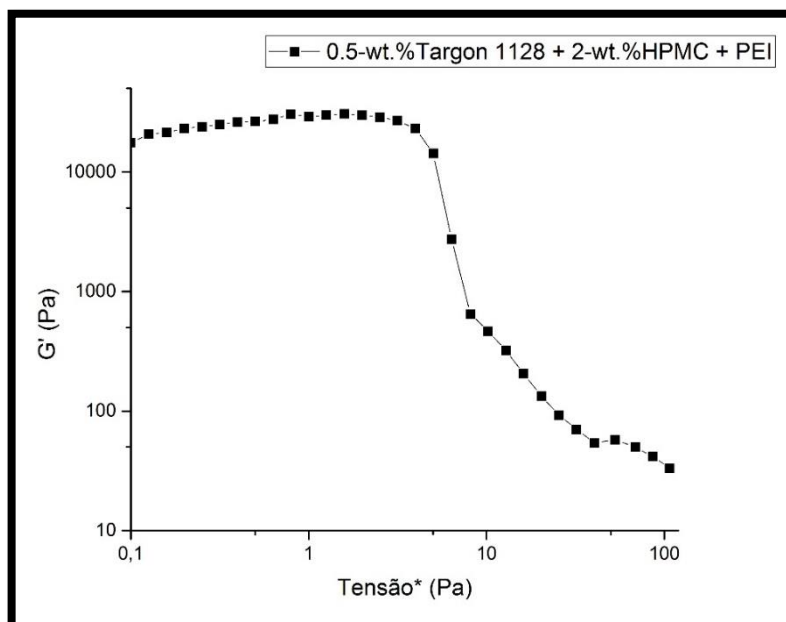


Figura 38 - Componente elástica da pasta com 40 vol.% de sólidos, preparada com 0.5 wt.% de Targon 1128, 2 wt.% de HPMC e de 2.28 wt.% PEI.

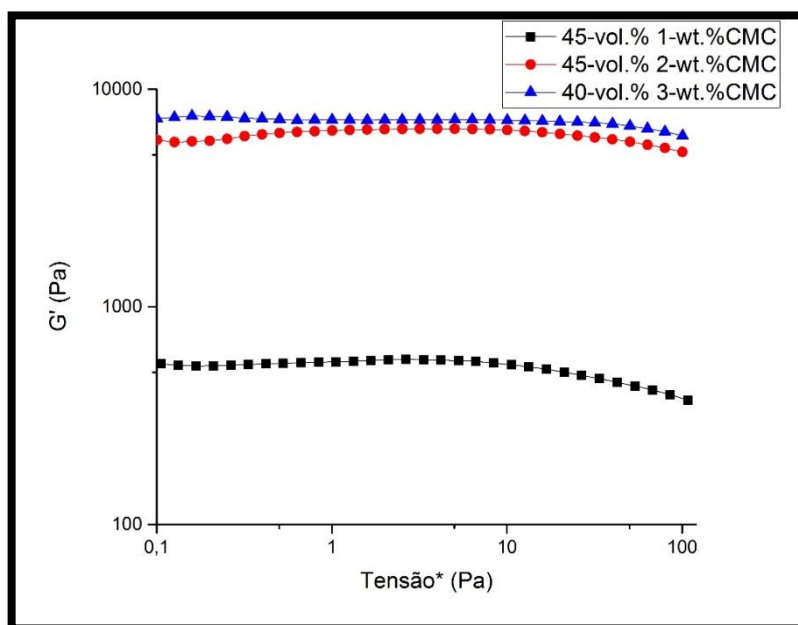
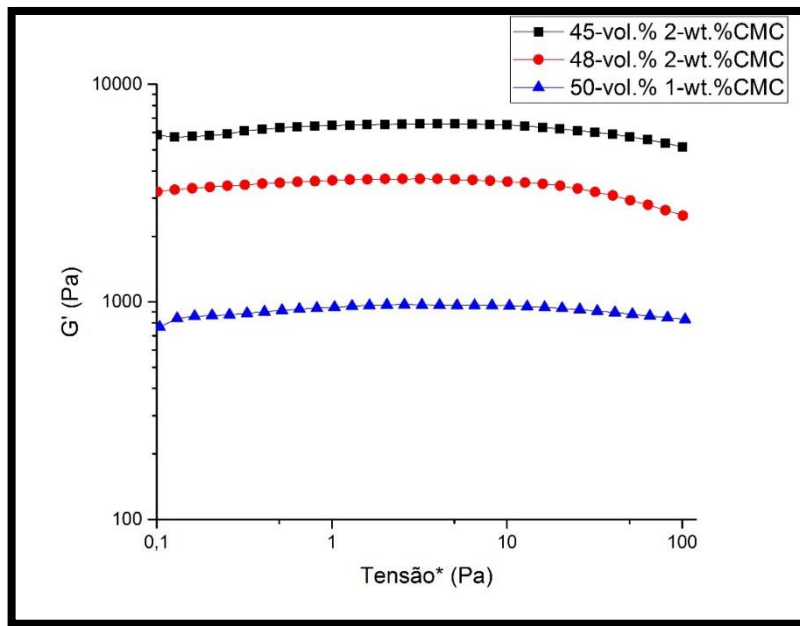


Figura 39 - Componente elástica das pastas preparadas com diferentes concentrações de CMC-250.

O aumento da rigidez das pastas com o aumento da concentração de CMC-250 de 1 wt.% para 2 wt.% a uma concentração fixa (45 vol.%) de sólidos, e a manutenção ou mesmo o ligeiro aumento verificado com o decréscimo da concentração de sólidos para 40 vol.% e o incremento do teor de CMC-250 para 3 wt.% podem ser atribuídos às interações intermoleculares complexas entre as longas cadeias do CMC-250 e a superfície das partículas, bem como entre essas mesmas cadeias e a água usada como solvente. Em artigos anteriores em que o CMC-250 foi pela primeira vez usado como aditivo único mas multifuncional [78], em pastas do biovidro 45S5 Bioglass<sup>®</sup>, verificou-se que a região de viscoelasticidade linear era mais extensa para 1 wt.% de CMC-250, ficando a janela de processamento mais estreita com o aumento do seu teor para 2 wt.%. Os valores de  $G'$  mais elevados e a janela de processamento mais alargada com a adição de 1 wt.% de CMC-250 foram atribuídos ao mecanismo de floculação por formação de pontes permitido pelo longo comprimento das cadeias do polímero e pela sua insuficiente cobertura da superfície das partículas. O aumento do teor de CMC-250 para 2 wt.% tornava este mecanismo menos ativo por as cadeias poliméricas tenderem a ser adsorvidas à volta de uma única partícula soltando-se das partículas vizinhas, e pela maior disponibilidade do adsorbato, resultando num recobrimento mais extenso da superfície das partículas. Mas foi também sugerido que para 2 wt.% de CMC-250 os laços e caudas das cadeias adsorvidas à volta das partículas seriam mais interpenetrantes e deveriam promover uma viscosidade intrínseca mais elevada do meio de dispersão, e fortalecer a estrutura dos sistemas em situação de quase repouso. Este último efeito deverá ser ainda mais exacerbado com o aumento do teor de CMC-250 para 3 wt.%, mais do que compensando pelo consequente abaixamento da concentração de sólidos para 40 vol.%, como se mostra na Figura 39.

Com base nos resultados anteriores, decidiu-se limitar o teor de CMC-250 a 2 wt.% e maximizar a concentrações de sólidos (48 vol.%). Só foi possível ir acima deste valor (até 50 vol.%), sacrificando o teor de CMC-250 que foi baixado para 1 wt.%. A componente elástica das pastas preparadas nestas condições está representada na Figura 40. Verifica-se que o aumento do teor de sólidos na pasta para um teor fixo de CMC-250 provoca uma diminuição do seu carácter elástico. Esta evolução é consistente com o decréscimo da viscosidade das mesmas suspensões quando testadas em modo rotativo (Figura 37). Uma hipótese explicativa para estes resultados poderia ser uma alteração da configuração das cadeias poliméricas adsorvidas.



**Figura 40 - Componente elástica das pastas preparadas com diferentes concentrações de sólidos e de CMC-250.**

Sugere-se que a liberdade das cadeias poliméricas adsorvidas para formar laços e caudas distendidos para a solução seja menor nos sistemas mais concentrados e que as cadeias tendam a ficar mais compactadas junto da superfície das partículas. Uma tal configuração seria menos favorável à interpenetração dos laços e caudas adsorvidos em partículas diferentes, levando a uma consequente diminuição do contributo deste mecanismo para a componente elástica das pastas. Esta hipótese explicativa também é consistente com os resultados apresentados na Figura 39, nomeadamente, com os valores de  $G'$  ligeiramente superiores da pasta menos concentrada em sólidos mas com um teor de CMC-250 para 3 wt.%.

Após o estudo reológico acerca dos efeitos dos aditivos de processamento e das suas respetivas concentrações, optou-se por preparar duas pastas extrudíveis com as seguintes composições:

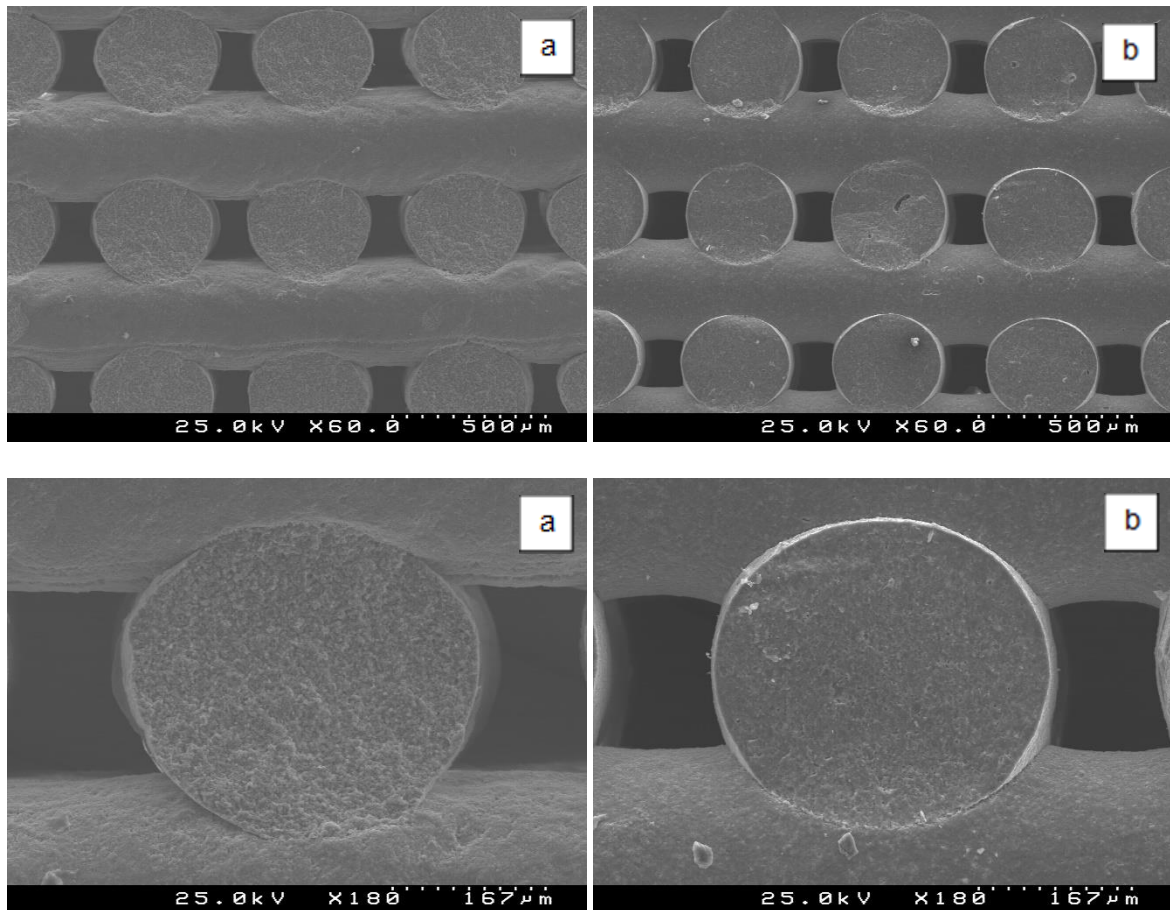
- 47 vol.% de sólidos, 0.5 wt.% de Targon 1128, 2 wt.% de HPMC, 1 wt.% de Aristoflex® TAC;
- 48 vol.% de sólidos, 2 wt.% de CMC-250.

Com estas pastas, procedeu-se à impressão robótica e posterior análise microestrutural dos corpos 3D a fim de selecionar as condições mais adequadas para o processamento dos *scaffolds*.

#### 4.4. Caracterização dos *scaffolds*

##### 4.4.1. Análise morfológica

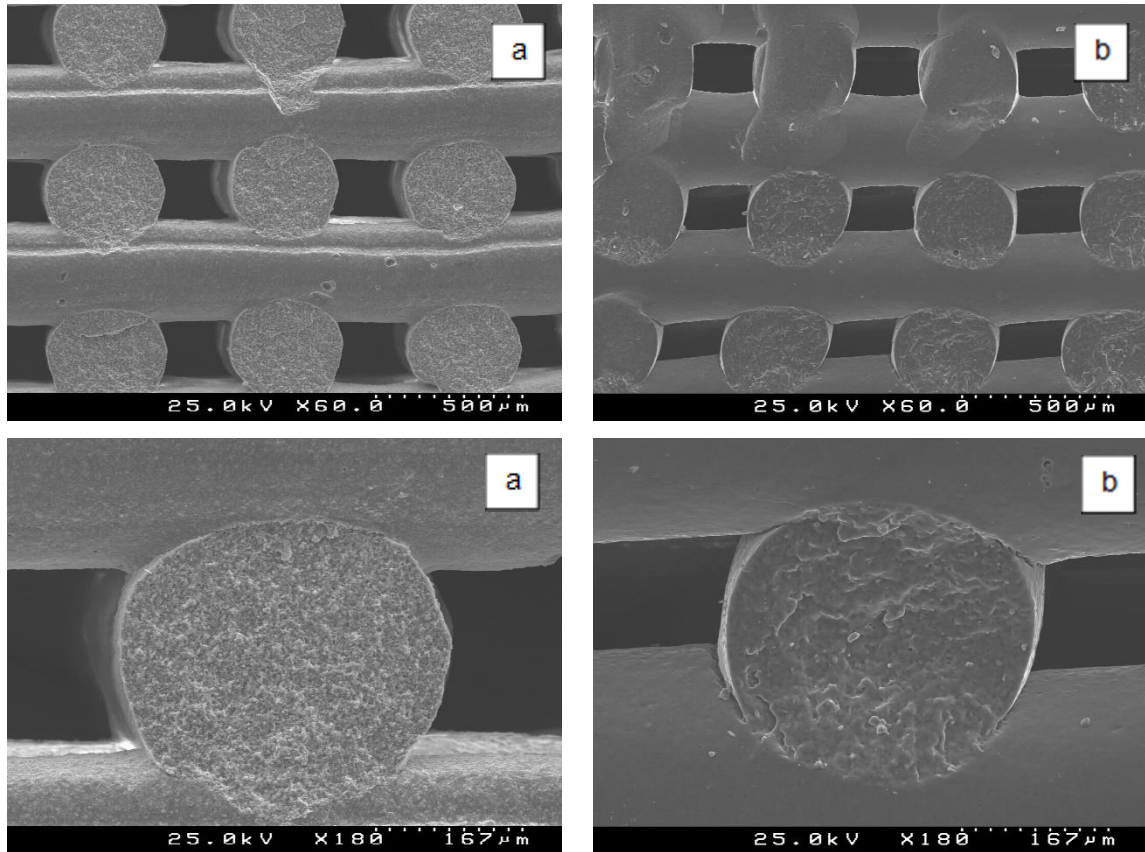
A Figura 41 mostra algumas micrografias dos *scaffolds* obtidas por SEM com um tamanho de poro predefinido de 200  $\mu\text{m}$  (distância entre dois filamentos), produzidos a partir das duas pastas preparadas nas condições selecionadas na secção anterior.



**Figura 41 - Micrografias obtidas por SEM dos *scaffolds* com tamanhos de poro de 200  $\mu\text{m}$  derivados de pastas com diferentes formulações: a) 47 vol.% de sólidos, 0.5 wt.% de Targon 1128, 2 wt.% de HPMC e 1 wt.% de TAC; b) 48 vol.% de sólidos e 2 wt.% de CMC-250.**

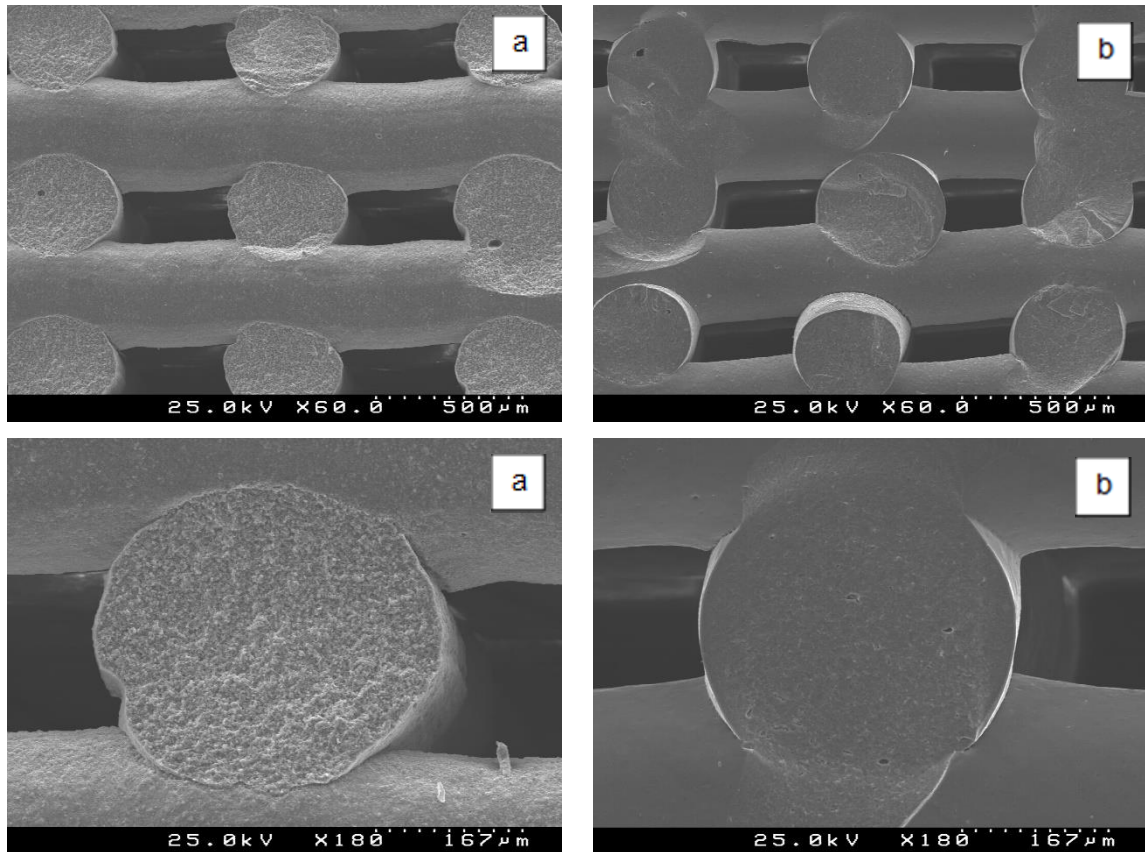


As micrografias dos *scaffolds* derivados das mesmas pastas, mas com um tamanho de poro de 300  $\mu\text{m}$  estão representadas da Figura 42.



**Figura 42 - Micrografias obtidas por SEM dos *scaffolds* com tamanhos de poro de 300  $\mu\text{m}$  com diferentes composições: a) 47 vol.% de sólidos, 0.5 wt.% de Targon 1128, 2 wt.% de HPMC e 1 wt.% de TAC; b) 48 vol.% de sólidos e 2 wt.% de CMC-250.**

Na Figura 43 é possível visualizar as micrografias dos *scaffolds* derivados das mesmas pastas, mas com tamanho de poro de 500  $\mu\text{m}$ .



**Figura 43 - Micrografias obtidas por SEM dos *scaffolds* com tamanhos de poro de 500 µm com diferentes composições: a) 47 vol.% de sólidos, 0.5 wt.% de Targon 1128, 2 wt.% de HPMC e 1 wt.% de TAC; b) 48 vol.% de sólidos e 2 wt.% de CMC-250.**

Da análise das figuras pode verificar-se a presença de uma estrutura com poros bem definidos e interligados, importante para a vascularização. Observa-se ainda uma boa adesão entre as camadas adjacentes, não se detetando alteração significativa da sua forma após a sobreposição de outras camadas. As secções transversais dos cilindros revelam estruturas densas. Alguns poros isolados de maiores dimensões derivam de bolhas de ar aprisionadas devido a insuficiente desarejamento da pasta. A Figura 44 mostra microestruturas mais detalhadas das secções transversais dos cilindros, confirmando o elevado grau de densificação dos *scaffolds*.

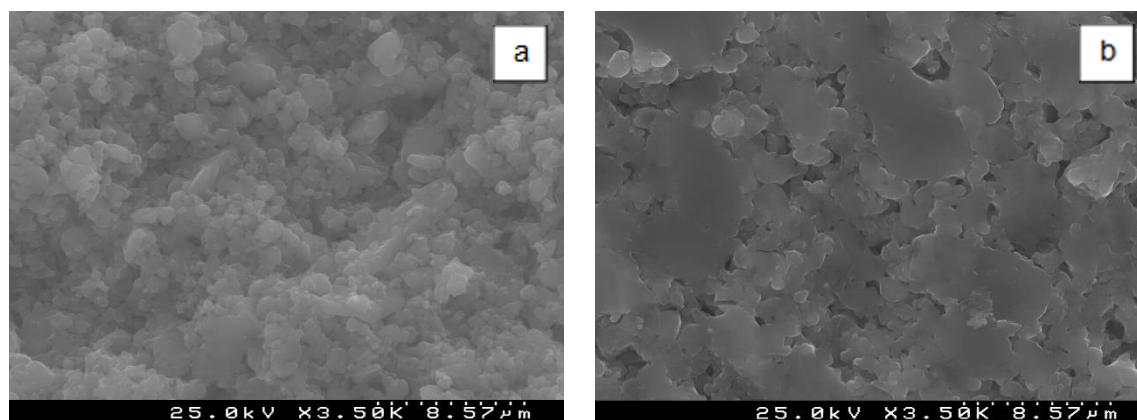


Figura 44 - Micrografias obtidas por SEM da microestrutura dos *scaffolds* com diferentes composições: a) 47 vol.% de sólidos, 0.5 wt.% de Targon 1128, 2 wt.% de HPMC e 1 wt.% de TAC; b) 48 vol.% de sólidos e 2 wt.% de CMC-250.

#### 4.4.2. Tamanho de poro

As imagens anteriores foram utilizadas para medir o tamanho de poro final dos *scaffolds*, e calcular a respectiva retração. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 13.

Tabela 13 - Tamanhos de poro dos *scaffolds* após sinterização e respectiva retração.

Composição	Tamanho de poro ( $\mu\text{m}$ )		Retração (%)
	Inicial	Final	
Targon + HPMC + TAC	200	$140 \pm 10$	$30 \pm 5$
	300	$241 \pm 9.4$	$18 \pm 3.5$
	500	$390 \pm 7.8$	$22 \pm 1.5$
CMC-250	200	$140 \pm 14.7$	$30 \pm 7.3$
	300	$225 \pm 9.8$	$24.7 \pm 3.2$
	500	$409 \pm 14.5$	$18.2 \pm 2.9$

Tal como seria de esperar, uma vez que as concentrações de sólidos das suspensões não são muito elevadas, existe uma retração durante a etapa de sinterização. Ainda assim, os *scaffolds* apresentam um tamanho de poro adequado para a vascularização, formação de tecido novo e remodelação óssea.

#### 4.4.3. Porosidade

As frações de porosidade dos *scaffolds* foram calculadas conforme descrito no capítulo do Procedimento Experimental. Para que um *scaffold* possa atuar como elemento de substituição temporária de tecido ósseo, a fração de poros não deve ser demasiado alta para não comprometer a resistência mecânica dos *scaffolds*, nem tão baixo que dificulte a migração celular. As percentagens de porosidade médias variaram entre cerca de 30–65% (Tabela 14).

Tabela 14 - Valores de porosidade média para cada composição estudada e respetivos desvios padrão.

Composição	Tamanho de poro	Porosidade (%)
Targon + HPMC + TAC	200	38.7 ± 1.5
	300	53.3 ± 7.4
	500	64.8 ± 3.6
CMC-250	200	31.6 ± 1.9
	300	44.1 ± 1.1
	500	52.6 ± 6.8

#### 4.4.4. Ensaio mecânicos

A Figura 45 representa o gráfico da resistência à compressão dos *scaffolds* preparados com Targon, HPMC e TAC, com os diferentes tamanhos de poro, e respetivo valor médio.

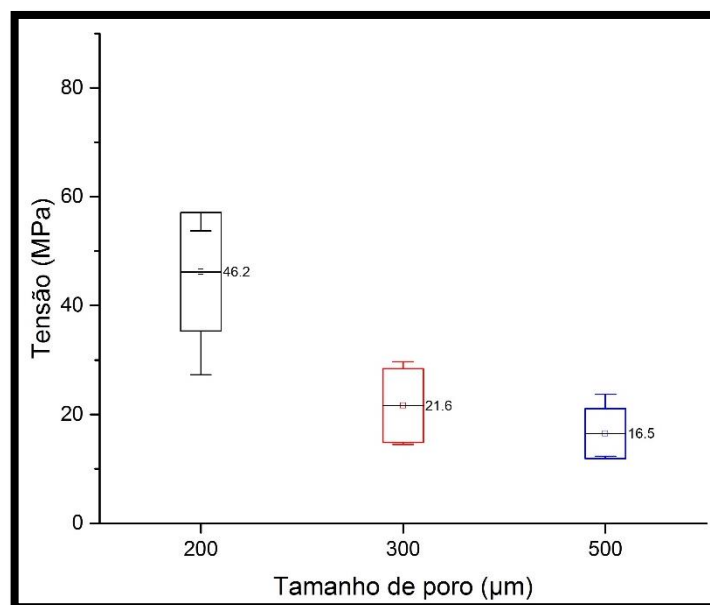


Figura 45 - Resistência à compressão dos diferentes *scaffolds* preparados com Targen, HPMC e TAC.

A Figura 46 representa o gráfico da resistência à compressão dos *scaffolds* preparados com o aditivo único CMC-250, com os diferentes tamanhos de poro, e respectivo valor médio.

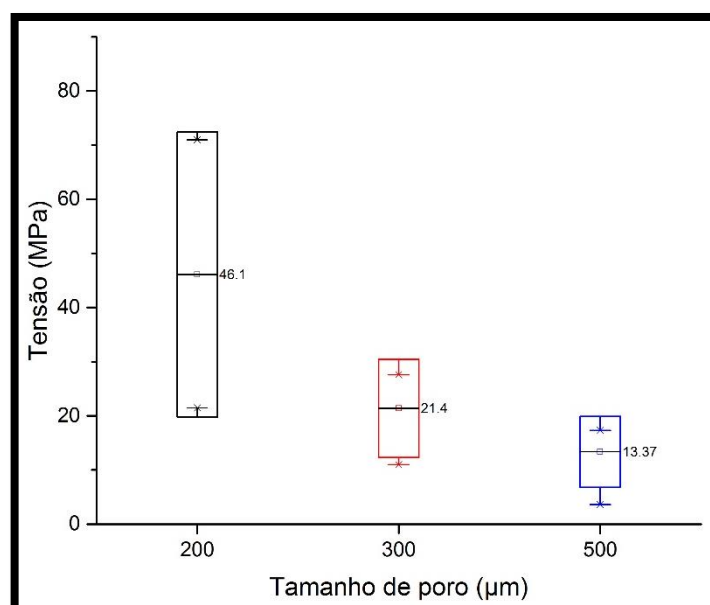


Figura 46 - Resistência à compressão dos diferentes *scaffolds* preparados com CMC-250.

A resistência à compressão do osso esponjoso humano varia entre 2–12 MPa [86]. A resistência à compressão dos *scaffolds* testados, com os três tamanhos de poro diferentes, é superior à do osso esponjoso, o que os torna fáceis de manusear.

Verifica-se uma diminuição da resistência à compressão com o aumento do tamanho de poro e porosidade, nas duas composições testadas. Este comportamento era esperado, uma vez que a arquitetura do *scaffold* influencia o seu comportamento mecânico, na medida em que quanto maior for o tamanho de poro e a porosidade, menor é a sua resistência mecânica.

Não existem diferenças significativas quanto aos valores médios da resistência de compressão entre os *scaffolds* das duas composições diferentes submetidos aos ensaios mecânicos.

Os *scaffolds* de TCP-20 produzidos por *robocasting* apresentam uma resistência mecânica significativamente mais elevada do que outros *scaffolds* inorgânicos preparados por métodos tradicionais, por exemplo *scaffolds* de HAp (inferior a 0.29 MPa) [87], 45S5 Bioglass (inferior a 0.4 MPa) [52] e  $\text{CaSiO}_3$  (inferior a 0.4 MPa) [88]. Segundo um estudo recente, para o mesmo método de fabrico utilizado no presente trabalho, os *scaffolds* de 45S5 Bioglass® apresentam valores de resistência à compressão entre 3 e 14 MPa [89].

Uma vez que o método de fabrico utilizado neste trabalho permite que a porosidade do *scaffold* seja controlada, o *scaffold* apresenta uma estrutura de poro mais uniforme e contínua. De um modo geral, uma estrutura de poros uniforme e contínua melhora a resistência mecânica [90].

Na Tabela 15 estão representados os módulos de Young do TCP-20, calculados a partir dos dados obtidos dos ensaios mecânicos.

**Tabela 15 - Módulos de Young obtidos para os *scaffolds* com diferentes porosidades.**

Composição	Tamanho de poro ( $\mu\text{m}$ )	Módulo de Young (GPa)
<b>Targon + HPMC + TAC</b>	200	$1.5 \pm 0.3$
	300	$0.5 \pm 0.3$
	500	$0.7 \pm 0.2$
<b>CMC-250</b>	200	$1.3 \pm 0.3$
	300	$1 \pm 0.4$
	500	$0.4 \pm 0.05$

Através da Tabela 15, é possível verificar que os valores obtidos se encontram na gama de valores do módulo de Young para o osso esponjoso, que varia de 0.1 a 2 GPa [91]. Verifica-se também que há uma variação dos valores do módulo de Young com o tamanho de poro e a porosidade [92]. Para o *scaffold* com um menor tamanho de poro e porosidade, é apresentado um maior valor do módulo de Young. Tal como nos resultados da resistência à compressão, também nos valores do Módulo de Young não se verificam diferenças significativas entre as duas composições de *scaffolds* testados.





# Capítulo 5

---

## Conclusões e Futuros Desenvolvimentos



## 5. Conclusões e Futuros Desenvolvimentos

Com o presente trabalho foi possível obter pastas concentradas à base de vidro bioativo, com o objetivo de produzir *scaffolds*, através da técnica de *robocasting*, para aplicações na regeneração óssea. Realizou-se um extenso trabalho experimental, que envolveu estudos químicos, físicos, morfológicos e mecânicos considerando os materiais não processados (pós) e os processados (*scaffolds*).

O estudo incluiu as seguintes etapas: (1) preparação e caracterização dos pós de vidro bioativo; (2) preparação e caracterização de suspensões concentradas à base de vidro bioativo em meio aquoso; (3) preparação e caracterização da pasta para impressão robótica; (4) fabrico de *scaffolds* à base de vidro bioativo com variações na dimensão da sua porosidade por processamento aditivo (*robocasting*), com respetiva caracterização morfológica (SEM) e comportamento mecânico.

Na etapa de produção e caracterização dos pós de vidro bioativo, de referência TCP-20, obtiveram-se partículas com tamanho micrométrico, após várias etapas de moagem. As partículas apresentam uma forma irregular e tendência para a aglomeração na ausência de dispersante.

Foi possível preparar duas pastas com um comportamento reológico indicado para a extrusão no robocasting, recorrendo a um dispersante (Targon 1128), um ligante (HPMC) e um floculante (Aristoflex® TAC), aditivos que apresentaram melhores resultados para o fabrico de estruturas 3D através desta técnica, e também com a utilização de um único aditivo, o CMC-250.

As imagens obtidas mostram que os *scaffolds* têm uma arquitetura muito homogénea e uma distribuição de poros uniforme. Verifica-se também que os resultados teóricos e experimentais são muito semelhantes, revelando uma boa precisão do sistema de extrusão utilizado.

As propriedades mecânicas dos *scaffolds* apresentaram melhores resultados para o tamanho de poro e porosidade inferior. A evolução observada pode ser interpretada com base na arquitetura dos *scaffolds*: o aumento do tamanho de poro e da porosidade traduz-se num decréscimo das propriedades mecânicas.

As duas composições de *scaffolds* apresentam uma resistência mecânica à compressão superior à do osso esponjoso, e um módulo de Young que se encontra na gama de valores do osso esponjoso.

Os resultados mostraram que os *scaffolds* de vidro bioativo podem ser preparados com elevada resistência à compressão utilizando a deposição robótica de pastas à base de orgânicos. Com base na sua resistência à compressão e na microestrutura adequada para suportar o crescimento dos tecidos ósseos, pode concluir-se que os *scaffolds* produzidos no presente trabalho demonstram possuir os requisitos necessários para aplicações em Engenharia de Tecido ósseo.

#### Trabalho futuro

Os resultados obtidos no presente trabalho remeteram a algumas sugestões para a sua continuação, bem como ao aprofundamento de alguns aspetos no sentido de clarificar certos resultados. Deste modo sugere-se:

- Estudar a degradação dos *scaffolds* num líquido simulador corporal;
- Realizar testes biológicos;
- Testar os *scaffolds in vivo* em animais de experimentação.

## Referências

- [1] C. T. Laurencin, A. M. Ambrosio, M. D. Borden, and J. A. Cooper, "Tissue engineering: orthopedic applications," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 1, pp. 19–46, 1999.
- [2] A. J. Salgado, O. P. Coutinho, and R. L. Reis, "Bone tissue engineering: State of the art and future trends," *Macromol. Biosci.*, vol. 4, pp. 743–765, 2004.
- [3] L. L. Hench, "The challenge of orthopaedic materials," *Curr. Orthop.*, vol. 14, no. 1, pp. 7–15, 2000.
- [4] B. P. Chan and K. W. Leong, "Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations," *Eur. Spine J.*, vol. 17 Suppl 4, pp. 467–79, Dec. 2008.
- [5] F. J. O'Brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering," *Mater. Today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, Mar. 2011.
- [6] L. L. Hench, "Bioceramics: From Concept to Clinic," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 74, pp. 1487–1510, 1991.
- [7] M. E. Gomes, H. L. Holtorf, R. L. Reis, and A. G. Mikos, "Influence of the porosity of starch-based fiber mesh scaffolds on the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured in a flow perfusion bioreactor," *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 4, pp. 801–809, 2006.
- [8] R. R. Seeley, P. Tate, and T. D. Stephens, *Anatomy & Physiology*. McGraw-Hill, 2008.
- [9] A. Rigutti and V. Ramiro, *Atlas Ilustrado de Anatomia*, 1st ed. Abrunheira: Girassol Edições, 2006.
- [10] A. I. Alford, K. M. Kozloff, and K. D. Hankenson, "Extracellular matrix networks in bone remodeling," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 65, pp. 20–31, 2015.
- [11] V. Sikavitsas, J. Temenoff, and A. Mikos, "Biomaterials and bone mechanotransduction," *Biomaterials*, vol. 22, pp. 2581–2593, 2001.
- [12] M. J. Olszta, X. Cheng, S. S. Jee, R. Kumar, Y. Y. Kim, M. J. Kaufman, E. P. Douglas, and L. B. Gower, "Bone structure and formation: A new perspective," *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 58, pp. 77–116, 2007.
- [13] D. R. Carter and W. C. Hayes, "Bone compressive strength: the influence of density and strain rate," *Science*, vol. 194, no. JANUARY 1977, pp. 1174–1176, 1976.
- [14] B. Watkins, H. Lippman, and L. Le Bouteiller, "Bioactive fatty acids: role in bone biology and bone cell function," *Prog. Lipid Res.*, vol. 40, pp. 125–148, 2001.
- [15] Y. Sugawara, R. Ando, H. Kamioka, Y. Ishihara, S. a. Murshid, K. Hashimoto, N. Kataoka, K. Tsujioka, F. Kajiya, T. Yamashiro, and T. Takano-Yamamoto, "The alteration of a mechanical property of bone cells during the process of changing from osteoblasts to osteocytes," *Bone*, vol. 43, pp. 19–24, 2008.
- [16] F. Barrère, C. A. van Blitterswijk, and K. de Groot, "Bone regeneration: Molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics," *International Journal of*

- Nanomedicine*, vol. 1, no. 3. pp. 317–332, 2006.
- [17] A. S. Mistry and A. G. Mikos, “Tissue Engineering Strategies for Bone Regeneration,” *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 94, pp. 1–22, 2005.
  - [18] A. Schindeler, M. M. McDonald, P. Bokko, and D. G. Little, “Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 19, no. 5, pp. 459–466, 2008.
  - [19] D. Sutherland and M. Bostrom, *Grafts and Bone Graft Substitutes*. 2005.
  - [20] P. V Giannoudis, H. Dinopoulos, and E. Tsiridis, “Bone substitutes: an update.,” *Injury*, vol. 36 Suppl 3, pp. S20–7, Nov. 2005.
  - [21] G. Zimmermann and A. Moghaddam, “Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes,” *Injury*, vol. 42, pp. S16–S21, 2011.
  - [22] H. G. Moghaddam, G. K. . Sándor, H. H. . Holmes, and C. M. . Clokie, “Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogeneic and alloplastic bone substitutes,” *J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 62, no. 2, pp. 202–213, Feb. 2004.
  - [23] A. Oryan, S. Alidadi, A. Moshiri, and N. Maffulli, “Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions.,” *J. Orthop. Surg. Res.*, vol. 9, no. 1, p. 18, Jan. 2014.
  - [24] A. J. Salgado, O. P. Coutinho, and R. L. Reis, “Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends,” *Macromol. Biosci.*, vol. 4, no. 8, pp. 743–765, 2004.
  - [25] J. Park and R. Lakes, “Tissue Engineering materials and regeneration,” *Biomaterials*, pp. 485–515, 2007.
  - [26] M. Teschner, “Tissue engineering of bone tissue,” *Z. Orthop. Ihre Grenzgeb.*, vol. 137, no. 6, pp. Oa4–a7, 2002.
  - [27] K. J. Burg, S. Porter, and J. F. Kellam, “Biomaterial developments for bone tissue engineering.,” *Biomaterials*, vol. 21, pp. 2347–2359, 2000.
  - [28] V. Olivier, N. Fauchoux, and P. Hardouin, “Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery,” *Drug Discov. Today*, vol. 9, no. 18, pp. 803–811, 2004.
  - [29] K. F. Leong, C. M. Cheah, and C. K. Chua, “Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs,” *Biomaterials*, vol. 24, pp. 2363–2378, 2003.
  - [30] R. Langer and J. P. Vacanti, “Tissue Engineering,” *Science (80-. )*, vol. 260, pp. 920–926, 1993.
  - [31] J. Berger, M. Reist, J. M. Mayer, O. Felt, N. a. Peppas, and R. Gurny, “Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 57, pp. 19–34, 2004.
  - [32] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher, “Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification,” *Cell*, vol. 126, pp. 677–689, 2006.
  - [33] L. E. Freed and G. Vunjak-Novakovic, “Culture of organized cell communities,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 33, no. 1–2, pp. 15–30, 1998.
  - [34] S. Yang, K. F. Leong, Z. Du, and C. K. Chua, “The design of scaffolds for use in tissue engineering,” *Tissue Eng.*, vol. 7, no. 6, pp. 679–689, 2001.

- [35] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, *Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine*, 2nd ed. Elsevier Academic Press, 2004.
- [36] I. Schwartz, B. P. Robinson, J. O. Hollinger, E. H. Szachowicz, and J. Brekke, "Calvarial bone repair with porous D, L-polylactide," *Otolaryngol. - Head Neck Surg.*, vol. 112, pp. 707–713, 1995.
- [37] B. D. Boyan, T. W. Hummert, D. D. Dean, and Z. Schwartz, "Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response," *Biomaterials*, vol. 17, no. 2, pp. 137–146, 1996.
- [38] D. Shi, *Introduction to Biomaterials*. Beijing: Tsinghua University Press, 2013.
- [39] S. M. Best, A. E. Porter, E. S. Thian, and J. Huang, "Bioceramics: Past, present and for the future," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 28, no. 7, pp. 1319–1327, 2008.
- [40] L. L. Hench, "Bioceramics," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 81, pp. 1705–1728, 1998.
- [41] J. R. Jones, "New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 29, pp. 1275–1281, 2009.
- [42] H. Oonishi, L. L. Hench, J. Wilson, F. Sugihara, E. Tsuji, M. Matsuura, S. Kin, T. Yamamoto, and S. Mizokawa, "Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass<sup>®</sup>, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 51, pp. 37–46, 2000.
- [43] L. L. Hench, "The story of Bioglass," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 17, pp. 967–978, 2006.
- [44] I. D. Xynos, A. J. Edgar, L. D. K. Buttery, L. L. Hench, and J. M. Polak, "Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass<sup>®</sup> 45S5 dissolution," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 55, pp. 151–157, 2001.
- [45] D. Shi, *Biomaterials and Tissue Engineering*. Springer, 2004.
- [46] P. E. Silva Junior and R. L. Oréfice, "Compósitos Bioativos Obtidos a Partir da Inserção de Vidro Bioativo em Matriz de Poli(Metacrilato de Metila)," *Polímeros*, vol. 11, no. 3, pp. 109–115, 2001.
- [47] I. Farooq, Z. Imran, U. Farooq, A. Leghari, and H. Ali, "Bioactive Glass: A Material for the Future," *World J. Dent.*, vol. 3, no. June, pp. 199–201, 2012.
- [48] P. Sepulveda, J. R. Jones, and L. L. Hench, "In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 61, pp. 301–311, 2002.
- [49] S. Eqtesadi, A. Motealleh, P. Miranda, A. Pajares, A. Lemos, and J. M. F. Ferreira, "Robocasting of 45S5 bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 34, no. 1, pp. 107–118, 2014.
- [50] A. R. Boccaccini, Q. Chen, L. Lefebvre, L. Gremillard, and J. Chevalier, "Sintering, crystallisation and biodegradation behaviour of Bioglass-derived glass-ceramics," *Faraday Discuss.*, vol. 136, pp. 27–44; discussion 107–123, 2007.
- [51] M. D. O'Donnell, "Predicting bioactive glass properties from the molecular chemical composition: glass transition temperature," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 5, pp. 2264–2269, 2011.
- [52] Q. Z. Chen, I. D. Thompson, and A. R. Boccaccini, "45S5 Bioglass-derived glass-

- ceramic scaffolds for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 27, pp. 2414–2425, 2006.
- [53] Q. Chen, D. Mohn, and W. J. Stark, “Optimization of Bioglass® scaffold fabrication process,” *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 94, pp. 4184–4190, 2011.
- [54] J. M. F. Ferreira and A. Goel, “Bioactive glass compositions, their applications and respective preparation methods,” 2012.
- [55] A. Goel, S. Kapoor, R. R. Rajagopal, M. J. Pascual, H. W. Kim, and J. M. F. Ferreira, “Alkali-free bioactive glasses for bone tissue engineering: A preliminary investigation,” *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 1, pp. 361–372, 2012.
- [56] A. C. R. Videira, “Biofabricação de enxertos porosos de PCL/FastOs - aplicação óssea,” Universidade de Aveiro, 2013.
- [57] S. Eqtesadi, A. Motealleh, A. Pajares, and P. Miranda, “Effect of milling media on processing and performance of 13-93 bioactive glass scaffolds fabricated by robocasting,” *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 1, pp. 1379–1389, 2015.
- [58] P.-C. Chang, B.-Y. Liu, C.-M. Liu, H.-H. Chou, M.-H. Ho, H.-C. Liu, D.-M. Wang, and L.-T. Hou, “Bone tissue engineering with novel rhBMP2-PLLA composite scaffolds,” *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 81, no. August 2006, pp. 771–780, 2007.
- [59] B. Subia, J. Kundu, and S. Kundu, “Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications,” *Tissue Eng.*, no. 3, pp. 141–159, 2010.
- [60] P. Miranda, E. Saiz, K. Gryn, and A. P. Tomsia, “Sintering and robocasting of B-tricalcium phosphate scaffolds for orthopaedic applications,” *Acta Biomater.*, vol. 2, pp. 457–466, 2006.
- [61] J. a. Lewis, “Direct Ink Writing of 3D Functional Materials,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 16, no. 17, pp. 2193–2204, Nov. 2006.
- [62] D. W. Hutmacher, “Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues — state of the art and future perspectives,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 12, no. 1, pp. 107–124, 2001.
- [63] D. W. Hutmacher, “Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage,” *Biomaterials*, vol. 21, pp. 2529–2543, 2000.
- [64] Y. Maazouz, E. B. Montufar, J. Guillem-Marti, I. Fleps, C. Ohman, C. Persson, and M. P. Ginebra, “Robocasting of biomimetic hydroxyapatite scaffolds using self-setting inks,” *J. Mater. Chem. B*, pp. 5378–5386, 2014.
- [65] P. Miranda, A. Pajares, E. Saiz, A. P. Tomsia, and F. Guiberteau, “Mechanical properties of calcium phosphate scaffolds fabricated by robocasting,” *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 85, no. 1, pp. 218–27, Apr. 2008.
- [66] E. Munch, J. Franco, S. Deville, P. Hunger, E. Saiz, and a. P. Tomsia, “Porous ceramic scaffolds with complex architectures,” *Jom*, vol. 60, no. 6, pp. 54–59, 2008.
- [67] Q. Fu, E. Saiz, M. N. Rahaman, and A. P. Tomsia, “Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives,” *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 31, no. 7, pp. 1245 – 1256, 2012.
- [68] J. E. Smay, J. Cesarano, and J. a. Lewis, “Colloidal inks for directed assembly of 3-D periodic structures,” *Langmuir*, vol. 18, no. 18, pp. 5429–5437, 2002.
- [69] P. Miranda, A. Pajares, E. Saiz, A. P. Tomsia, and F. Guiberteau, “Fracture modes



- under uniaxial compression in hydroxyapatite scaffolds fabricated by robocasting,” *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 81, pp. 771–780, 2007.
- [70] S. (Universidade de A. Olhero, “Processamento de Nitreto de Alumínio ( AlN ) em meio aquoso,” 2006.
- [71] B. J. Kirby and E. F. Hasselbrink, “Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations,” *Electrophoresis*, vol. 25, no. 2, pp. 187–202, 2004.
- [72] R. J. Martins Réfega, “Nanopartículas para Aplicação Biomédica,” 2010.
- [73] W. E. WORRALL, *Ceramic Raw Materials*. Elsevier, 1982.
- [74] D. Munday, *Surfaces, Interfaces and Colloids — Principles and Applications, Second Edition by D. Myers, Wiley-VCH, New York, 1999, xx+501 pp., ISBN 0-471-33060-4; £61.50.*, vol. 51, no. 3. 2000.
- [75] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*. Elsevier, 2011.
- [76] J. N. Stuecker, J. Cesarano, and D. a. Hirschfeld, “Control of the viscous behavior of highly concentrated mullite suspensions for robocasting,” *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 142, no. 2, pp. 318–325, 2003.
- [77] Z. Adamczyk and P. Weroński, “Application of the DLVO theory for particle deposition problems,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 83, no. 1, pp. 137–226, 1999.
- [78] S. I. Conceição, J. L. Velho, and J. M. F. Ferreira, “Influence of deagglomeration and carboxymethyl cellulose binders on rheological behaviour of kaolin suspensions,” *Appl. Clay Sci.*, vol. 23, no. 5–6, pp. 257–264, 2003.
- [79] S. Kapoor, “Alkali -Free Bioactive Glasses For Bone Regeneration,” University of Aveiro.
- [80] J. J. Guo and J. Lewis, “Aggregation effects on the compressive flow properties and drying behavior of colloidal silica suspensions,” *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 82, no. 9, pp. 2345–2358, 1999.
- [81] R. M. GERMAN, “A measure of the number of particles in agglomerates,” *Int. J. powder Metall.*, vol. 32, no. 4, pp. 365–373.
- [82] S. Eqtesadi, A. Motealleh, P. Miranda, A. Lemos, A. Rebelo, and J. M. F. Ferreira, “A simple recipe for direct writing complex 45S5 Bioglass® 3D scaffolds,” *Mater. Lett.*, vol. 93, pp. 68–71, 2013.
- [83] X. Xing, G. Sun, Z. Li, and T. Ngai, “Stabilization of colloidal suspensions: Competing effects of nanoparticle halos and depletion mechanism,” *Langmuir*, vol. 28, no. 46, pp. 16022–16028, 2012.
- [84] S. Olhero and J. M. F. Ferreira, “Influence of particle size distribution on rheology and particle packing of silica-based suspensions,” *Powder Technol.*, vol. 139, no. 1, pp. 69–75, 2004.
- [85] C. Macosko, *Rheology: Principles, Measurements and Applications*, vol. 86, no. 3. 1996.
- [86] J. R. Jones, L. M. Ehrenfried, and L. L. Hench, “Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 7, pp. 964–973, 2006.
- [87] H. W. Kim, J. C. Knowles, and H. E. Kim, “Hydroxyapatite porous scaffold engineered with biological polymer hybrid coating for antibiotic Vancomycin

- release,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 16, pp. 189–195, 2005.
- [88] C. Wu, Y. Ramaswamy, P. Boughton, and H. Zreiqat, “Improvement of mechanical and biological properties of porous CaSiO<sub>3</sub> scaffolds by poly(d,l-lactic acid) modification,” *Acta Biomater.*, vol. 4, no. 2, pp. 343–353, 2008.
- [89] S. Eqtesadi, A. Motealleh, A. Pajares, F. Guiberteau, and P. Miranda, “Influence of sintering temperature on the mechanical properties of  $\epsilon$ -PCL-impregnated 45S5 bioglass-derived scaffolds fabricated by robocasting,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 35, pp. 3985–3993, 2015.
- [90] C. Wu, Y. Luo, G. Cuniberti, Y. Xiao, and M. Gelinsky, “Three-dimensional printing of hierarchical and tough mesoporous bioactive glass scaffolds with a controllable pore architecture, excellent mechanical strength and mineralization ability,” *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 6, pp. 2644–2650, 2011.
- [91] T. M. Keaveny and W. C. Hayes, “Mechanical Properties of Cortical and Trabecular Bone,” in *Bone growth*, 1993, pp. 285–344.
- [92] J. Kovacic, “Correlation between Young’s modulus and porosity in porous materials,” *J. Mater. Sci.*, vol. 18, pp. 1007–1010, 1991.

